

Année 1972

N° d'Ordre :

**PROFIL METABOLIQUE DES STEROIDES HORMONAUX
POSSIBILITE D'UNE METHODE D'ANALYSE
EN PHASE GAZEUSE**

THÈSE

présentée

par

Monsieur MADANI Christian

pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences d'Université

Soutenue le 14 Avril 1972, devant la Commission d'Examen :

JURY

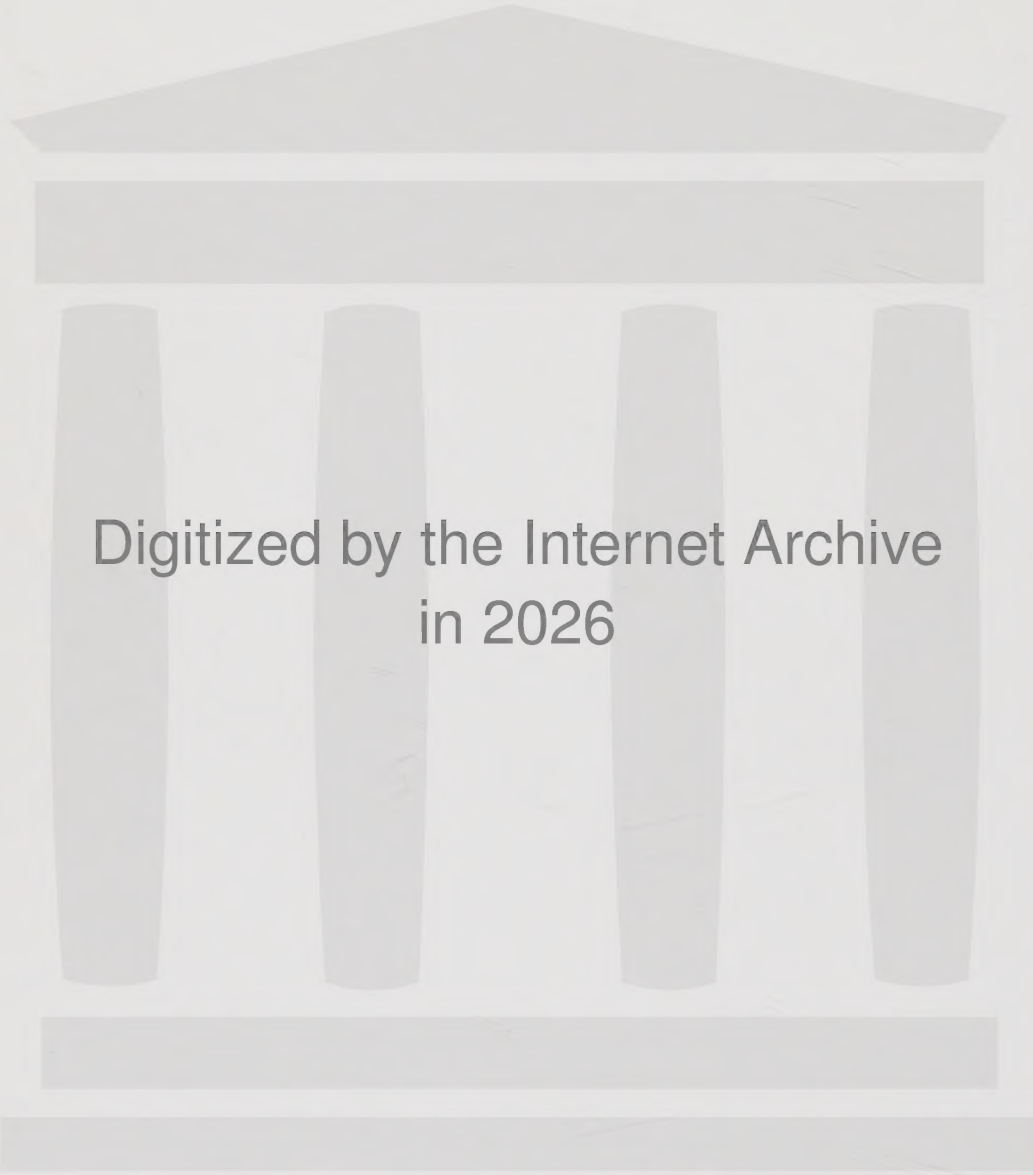
MM. A. RASSAT

Président

E. CHAMBAZ

J. PELMONT

P. VIGNAIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533909_0003

Année 1972

N° d'Ordre :

**PROFIL METABOLIQUE DES STEROIDES HORMONAUX
POSSIBILITE D'UNE METHODE D'ANALYSE
EN PHASE GAZEUSE**

THÈSE

présentée

par

Monsieur MADANI Christian

pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences d'Université

Soutenue le 14 Avril 1972, devant la Commission d'Examen :

JURY

MM. A. RASSAT

Président

E. CHAMBAZ

J. PELMONT

P. VIGNAIS

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

LISTE DES PROFESSEURS

Président : Monsieur Michel SOUTIF
Vice-Président : Monsieur Gabriel CAU

PROFESSEURS TITULAIRES

MM	ANGLES D'AURIAC Paul	Mécanique des fluides
	ARNAUD Georges	Clinique des maladies infectieuses
	ARNAUD Paul	Chimie
	AUBERT Guy	Physique
	AYANT Yves	Physique approfondie
Mme	BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM	BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale
	BARBIER Reynold	Géologie appliquée
	BARJON Robert	Physique nucléaire
	BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
	BARRA Jean-René	Statistiques
	BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
	BENOIT Jean	Radioélectricité
	BERNARD Alain	Mathématiques Pures
	BESSON Jean	Electrochimie
	BEZES Henri	Chirurgie générale
	BLAMBERT Maurice	Mathématiques pures
	BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
	BONNET Georges	Electrotechnique
	BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
	BONNET-EYMARD Joseph	Pathologie médicale
	BONNIER Etienne	Electrochimie Electrometallurgie
	BOUCHERLE André	Chimie et Toxicologie
	BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire
	BRAVARD Yves	Géographie
	BRISSENEAU Pierre	Physique du Solide
	BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
	CABANAC Jean	Pathologie chirurgicale
	CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologie
	CALAS François	Anatomie
	CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
	CAU Gabriel	Médecine légale et Toxicologie
	CAUQUIS Georges	Chimie organique

MM.	CHABAUTY Claude	Mathématiques Pures
	CHARACHON Robert	Oto-Rhino-Laryngologie
	CHATEAU Robert	Thérapeutique
	CHENE Marcel	Chimie papetière
	COEUR André	Pharmacie chimique
	CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
	COUDERC Pierre	Anatomie Pathologique
	CRAYA Antoine	Mécanique
Mme	DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM.	DEBELMAS Jacques	Géologie générale
	DEGRANGE Charles	Zoologie
	DESSAUX Georges	Physiologie animale
	DODU Jacques	Mécanique appliquée
	DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
	DREYFUS Bernard	Thermodynamique
	DUCROS Pierre	Cristallographie
	DUGOIS Pierre	Clinique de Dermatologie et Syphiligraphie
	FAU René	Clinique neuro-psychiatrique
	FELICI Noël	Electrostatique
	GAGNAIRE Didier	Chimie physique
	GALLISSOT François	Mathématiques Pures
	GALVANI Octave	Mathématiques Pures
	GASTINEL Noël	Analyse numérique
	GERBER Robert	Mathématiques Pures
	GIRAUD Pierre	Géologie
	KLEIN Joseph	Mathématiques Pures
Mme	KOFLER Lucie	Botanique et Physiologie végétale
MM.	KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques Pures
	KRAVTCHENKO Julien	Mécanique
	KUNTZMANN Jean	Mathématiques Appliquées
	LACAZE Albert	Thermodynamique
	LARCHARME Jean	Biologie végétale
	LATREILLE René	Chirurgie générale
	LATURAZE Jean	Biochimie pharmaceutique
	LAURENT Pierre	Mathématiques Appliquées
	LEDRU Jean	Clinique Médicale B
	LLIBOUTRY Louis	Géophysique
	LOUP Jean	Géographie
Mlle	LUTZ Elisabeth	Mathématiques Pures
	MALGRANGE Bernard	Mathématiques Pures
	MALINAS Yves	Clinique obstétricale

MM.	MARTIN-NOEL Pierre	Seméiologie médicale
	MASSEPORT Jean	Géographie
	MAZARE Yves	Clinique médicale A
	MICHEL Robert	Minéralogie et Pétrographie
	MOURIQUAND Claude	Histologie
	MOUSSA André	Chimie nucléaire
	NEEL Louis	Physique du Solide
	OZENDA Paul	Botanique
	PAUTHENET René	Electrotechnique
	PAYAN Jean-Jacques	Mathématiques Pures
	PEBAY-PEYROULA Jean-Claude	Physique
	PERRET René	Servomécanismes
	PILLET Emile	Physique industrielle
	RASSAT André	Chimie systématique
	RENARD Michel	Thermodynamique
	REULOS René	Physique industrielle
	RINALDI Renaud	Physique
	ROGET Jean	Clinique de pédiatrie et de puériculture
	SANTON Lucien	Mécanique
	SEIGNEURIN Raymond	Microbiologie et Hygiène
	SENGEL Philippe	Zoologie
	SILBERT Robert	Mécanique des fluides
	SOUTIF Michel	Physique générale
	TANCHE Maurice	Physiologie
	TRAYNARD Philippe	Chimie générale
	VAILLAND François	Zoologie
	VALENTIN Jacques	Physique Nucléaire
	VAUQUOIS Bernard	Calcul électronique
Mme	VERAIN Alice	Pharmacie galénique
M.	VERAIN André	Physique
Mme	VEYRET Germaine	Géographie
MM.	VEYRET Paul	Géographie
	VIGNAIS Pierre	Biochimie médicale
	YOCCOZ Jean	Physique nucléaire théorique

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	BULLEMER Bernhard	Physique
	HANO JUN-ICHI	Mathématiques Pures
	STEPHENS Michaël	Mathématiques Appliquées

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	BEAUDOING André	Pédiatrie
Mme	BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
MM	BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques appliquées
	BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
	BONNETAIN Lucien	Chimie minérale
Mme	BONNIER Jane	Chimie générale
MM.	CARLIER Georges	Biologie végétale
	COHEN Joseph	Electrotechnique
	COUMES André	Radioélectricité
	DEPASSEL Roger	Mécanique des Fluides
	DEPORTES Charles	Chimie minérale
	DESRE Pierre	Métallurgie
	GAUTHIER Yves	Sciences biologiques
	GEINDRE Michel	Electroradiologie
	GERMAIN Jean Pierre	Mécanique
	GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
	GLENAT René	Chimie organique
	HACQUES Gérard	Calcul numérique
	JANIN Bernard	Géographie
Mme	KAHANE Josette	Physique
MM.	MULLER Jean-Michel	Thérapeutique
	PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et minéralogie
	POULOUJADOFF Michel	Electrotechnique
	REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
	REVOL Michel	Urologie
	REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
	ROBERT André	Chimie papetière
	SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
	SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
	SIBILLE Robert	Construction Mécanique
	SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme	SOUTIF Jeanne	Physique générale

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mle	AGNIUS-DELORD Claudine	Physique pharmaceutique
	ALARY Josette	Chimie analytique
MM.	AMBLARD Pierre	Dermatologie
	AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie

MM.	ARMAND Yves	Chimie
	BEGUIN Claude	Chimie organique
	BELORIZKY Elie	Physique
	BENZAKEN Claude	Mathématiques Appliquées
	BILLET Jean	Géographie
	BLIMAN Samuel	Electronique (EIE)
	BLOCH Daniel	Electrotechnique
Mme	BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)
MM.	BOUCHET Yves	Anatomie
	BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques Appliquées
	BOUVARD Maurice	Mécanique des Fluides
	BRIERE Georges	Physique expérimentale
MM.	BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
	BRUGEL Lucien	Energétique
	BUISSON Roger	Physique
	BUTEL Jean	Orthopédie
	CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
	CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
	CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)
	CHIBON Pierre	Biologie animale
	COHEN-ADDAD Jean-Pierre	Spectrométrie physique
	COLOMB Maurice	Biochimie médicale
	CONTE René	Physique
	CROUZET Guy	Radiologie
	DURAND Francis	Métallurgie
	DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme	ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM.	FAURE Jacques	Médecine légale
	GAVEND Michel	Pharmacologie
	GENSAC Pierre	Botanique
	GIDON Maurice	Géologie
	GRIFFITHS Michaël	Mathématiques Appliquées
	GROULADE Joseph	Biochimie médicale
	HOLLARD Daniel	Hématologie
	HUGONOT Robert	Hygiène et Médecine préventive
	IDELMAN Simon	Physiologie animale
	IVANES Marcel	Electricité
	JALBERT Pierre	Histologie
	JOLY Jean-René	Mathématiques Pures

MM.	JOUBERT Jean-Claude	Physique du Solide
	JULLIEN Pierre	Mathématiques Pures
	KAHANE André	Physique générale
	KUHN Gérard	Physique
Mme	LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
MM.	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	LANCIA Roland	Physique atomique
	LE JUNTER Noël	Electronique
	LEROY Philippe	Mathématiques
	LOISEAUX Jean-Marie	Physique Nucléaire
	LONGQUEUE Jean-Pierre	Physique Nucléaire
	LUU DUC Cuong	Chimie Organique
	MACHE Régis	Physiologie végétale
	MAGNIN Robert	Hygiène et Médecine préventive
	MARECHAL Jean	Mécanique
	MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
	MAYNARD Roger	Physique du Solide
	MICHOULIER Jean	Physique (I.U.T. "A")
	MICOLD Max	Maladies infectieuses
	MORAU René	Hydraulique (INP)
	NEGRE Robert	Mécanique
	PARAMELLE Bernard	Pneumologie
	PECCOUD François	Analyse (IUT B)
	PEPFEN René	Métallurgie
	PELMONT Jean	Physiologie animale
	PERRET Jean	Neurologie
	PERRIN Louis	Pathologie expérimentale
	PFISTER Jean-Claude	Physique du Solide
	PHELIP Xavier	Rhumatologie
Mlle	PIERY Yvette	Biologie animale
MM.	RACHAIL Michel	Médecine interne
	RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
	RICHARD Lucien	Botanique
Mme	RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM.	ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
	ROUGEMONT (DE) Jacques	Neuro-Chirurgie
	SHAN Jean Claude	Chimie Générale
	STIEGLITZ Paul	Anesthésiologie
	STOEBNER Pierre	Anatomie pathologique

MM. VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques Appliquées
VEILLON Gérard	Mathématiques Appliquées (INP)
VIALON Pierre	Géologie
VOOG Robert	Médecine interne
VIROUSSE Constantine	Radiologie
ZADWORYN François	Electronique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

MM. BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
CHEEKE John	Thermodynamique
GOLDSCHMIDT Hubert	Mathématiques
SIDNEY STUARD	Mathématiques Pures
YACOURD Mahmoud	Médecine légale

CHARGES DE FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

Mme BERIEL Hélène	Physiologie
Mme RENAUDET Jacqueline	Microbiologie

Fait le 16 Novembre 1971

PROFIL METABOLIQUE
DES STEROIDES HORMONAUX :

POSSIBILITE D'UNE METHODE
D'ANALYSE EN PHASE GAZEUSE

S O M M A I R E

Introduction

Chapitre I - Rappel de biosynthèse et de métabolisme

- * Métabolisme périphérique et élimination
- * Généralités sur les méthodes d'exploration

Chapitre II - Matériel et méthodes

I - Chromatographie en phase gazeuse

- 1) Volume de rétention
- 2) Temps de rétention

- * Aspects qualitatifs
- * Résolution
- * Evaluation numérique des paramètres de rétention
 - 1) Séparation isotherme
 - 2) Séparation en température programmée
 - a - Indice de rétention
 - b - Unités de méthylène

II - Combinaison chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse.

- * Application à l'analyse des stéroïdes hormonaux.

III - Matériel et méthodes utilisées

1. Chromatographie

- a - Préparation de la colonne
- b - Préparation du support
- c - Garniture du support
- d - Conditions opératoires

2. Combinaison CG-SM

3. Scintillation liquide

4. Préparation de l'extrait biologique

- a - Recueil
- b - Hydrolyse

- c - Extraction
- d - Préparation des dérivés

5. Exploitation des chromatogrammes

- a - Aspects qualitatifs
- b - Aspects quantitatifs
- c - "Blanc" de la méthode

Chapitre III - Résultats

- 1 - Résultats chez les hommes normaux
- 2 - Résultats chez les femmes normales
- 3 - Spectres de masse

Chapitre IV - Discussion

I - Aspects méthodologiques

- 1) Choix de la phase stationnaire
- 2) Utilisation des dérivés
 - a - Ether de triméthylsilyle
 - b - Méthyloximes
 - c - Dérivés mixtes

II - Caractéristiques de notre méthode

- 1) Spécificité
- 2) Reproductibilité
 - a - Métabolites des androgènes
 - b - Métabolites de la progestérone
 - c - Métabolites des corticostéroïdes
- 3) Sensibilité
- 4) Exactitude

Chapitre V - Application en recherche métabolique

- 1) Troubles du métabolisme d'origine pharmacologique
 - a - Métopirone
 - b - ACTH
 - c - Dexaméthasone
 - d - Nialamide

- 2) Troubles du métabolisme d'origine enzymatique
- 3) Troubles du métabolisme d'origine tumorale

Conclusion

Bibliographie

PRINCIPALES ABREVIATIONS
UTILISEES

STEROIDES

<u>Nom commun</u>	<u>Abréviation</u>	<u>Nom systématique</u>
. Androstérone	A	3 α Hydroxy 5 α Androstane 17 one
. Etiocholanolone	E	3 α Hydroxy 5 β Androstane 17 one
. Déhydroépiandrostérone	DHA	3 β Hydroxyandrost 5 ène 17 one
. 11 Céto Androstérone	11 C A	3 α Hydroxy 5 α Androstane 11, 17 dione
. 11 Céto Etiocholanolone	11 C E	3 α Hydroxy 5 β Androstane 11, 17 dione
. 11 OH Androstérone	11. OH A	3 α , 11 β Dihydroxy 5 α Androstane 17 one
. 11 OH Etiocholanolone	11 OH E	3 α , 11 β Dihydroxy 5 β Androstane 17 one
. Prégnanediol	Pd	3 α 20 α Dihydroxy 5 β Prénane
. Prégnanetriol	Pt	3 α 17 α 20 α Trihydroxy 5 β Prénane
. Tétrahydrodéoxycortisol	THS	3 α 17 α 21 Trihydroxy 5 β Prénane 20 one
. Tétrahydrocortisone	THE	3 α 17 α 21 Trihydroxy 5 β Prénane 11, 20 dione
. Tétrahydrocortisol	THF	3 α , 11 β , 17 α 21 Tétrahydroxy 5 β Prénane 20 one
. allo-Tétrahydrocortisol	a-THF	3 α , 11 β , 17 α 21 Tétrahydroxy 5 α Prénane 20 one

. Cortolone	---	$3\alpha, 17\alpha, 20\alpha, 21$ Tétrahydroxy 5β Prégnane 11 one
. β Cortolone	---	$3\alpha, 17\alpha, 20\beta, 21$ Tétrahydroxy 5β Prégnane 11 one
. Cortol	---	$3\alpha, 11\beta, 17\alpha, 20\alpha, 21$ Pentahydroxy 5β Prégnane
. Prégnenolone	---	3β Hydroxy Pregn 5 ène 20 one
. 17 Hydroxy Prégnenolone	---	$3\beta, 17\alpha$ Dihydroxy Pregn 5 ène 20 one
. Progestérone	---	Pregn 4 ène 3,20 dione
. 17 Hydroxy Progestérone	---	17α Hydroxy Pregn 4 ène 3,20 dione
. Testostérone	---	17β Hydroxy Pregn 4 ène 3 one
. Prégnanetriolone	---	$3\alpha, 17\alpha, 20\alpha$ Trihydroxy 5β Prégnane 20 one
. Androstènedione	---	Androst 4 ène 3,17 dione
. Désoxycorticostérone	DOC	21 Hydroxy Pregn 4 ène 3,20 dione
. Oestrone	E_1	3β Hydroxyestra 1,3,5 (10) triène 17 one
. Oestradiol	E_2	$3\beta, 17\beta$ Dihydroxyestra 1,3,5 (10) triène 17 one
. Cholestérol	---	3β Hydroxycholest 5 ène

HORMONES HYPOPHYSAIRES

F.S.H. : Follicle Stimulating Hormone

L.H. : Luteinizing Hormone

H.C.G. : Human Chorionic Gonadotrophin

PRODUITS CHIMIQUES

PERMABLEND : PPO + DIMETHYL POPOP PACKARD

PPO = 2,5-diphényloxazol

Diméthyl POPOP = 1,4 bis 2(4 méthyl 5 phényloxazolyl)benzène

BSTFA = Bistriméthyl silyl trifluoro acétamide

BSA = Bistriméthyl silyl acétamide

HMDS = Hexaméthylidisilazane

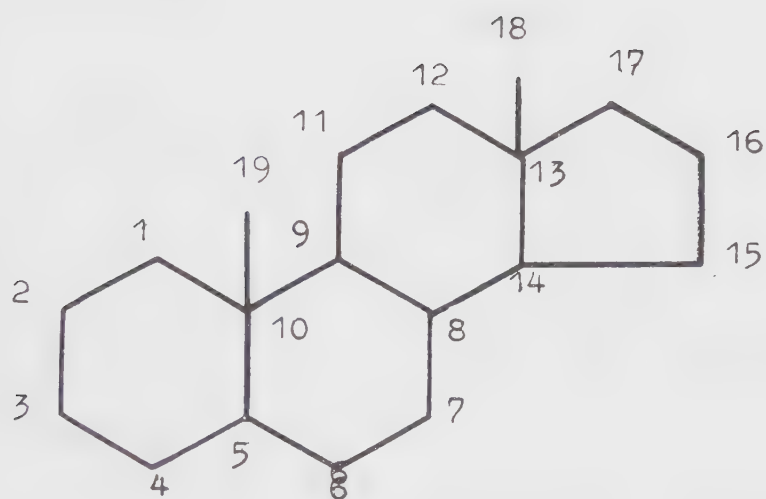
TMCS = Triméthyl chloro silane

DMCS = Diméthyl dichloro silane

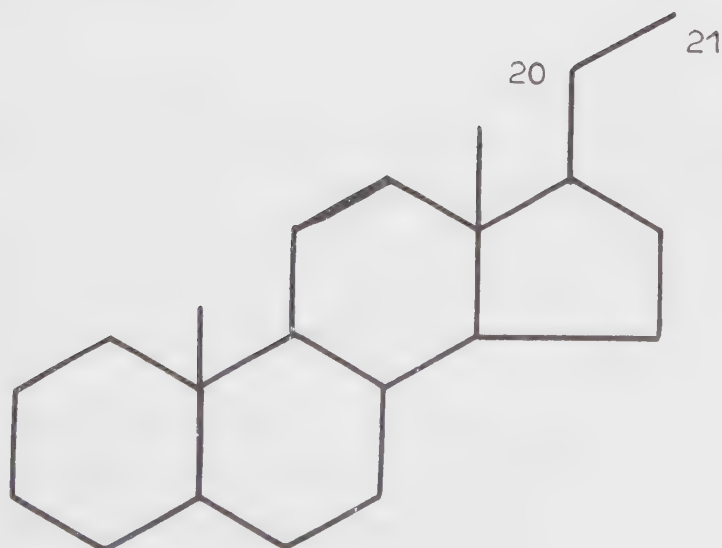
TSIM = Triméthyl silyl imidazole

SQUELETTES STERODIENS

I . ANDROSTANE



II . PREGNANE



I N T R O D U C T I O N

Les développements des possibilités d'étude des stéroïdes hormonaux pendant ces dix dernières années ont rendu possible l'accès, aussi bien aux formes actives qu'à leurs métabolites, et ceci à des niveaux de détection très faibles (inférieur au microgramme).

Ces progrès ont permis d'envisager l'étude des stéroïdes hormonaux sous deux angles différents :

- . l'accès à un stéroïde actif particulier. Son isolement du milieu biologique nécessite alors la mise en oeuvre d'une méthodologie de caractérisation et de purification préalable au dosage, qui peut être extrêmement laborieuse. L'information obtenue ne concerne alors évidemment que le seul stéroïde étudié.

- . La résolution considérable, atteinte par la chromatographie en phase gazeuse, permet l'accès, non plus à un seul composé isolé, mais à un ensemble de métabolites. La combinaison de cette technologie à la spectrométrie de masse, formant ainsi un ensemble intégré en phase gazeuse, permet à la fois la séparation, l'identification et la quantification des stéroïdes hormonaux sans que les composés individuels aient été isolés.

Les développements actuels de cette méthodologie (chromatographie-spectrométrie de masse-ordinateur), nécessitent cependant des conditions initiales impératives : transformation des stéroïdes en dérivés volatils et séparation. La chromatographie en phase gazeuse, reste donc, un élément fondamental de cet ensemble.

Nous nous sommes attachés dans ce travail, à développer et à codifier les conditions d'application d'une méthode de séparation, utilisant l'analyse en phase gazeuse des métabolites urinaires neutres des stéroïdes hormonaux, de façon à disposer d'une méthode utilisable en recherche métabolique.

CHAPITRE I.

RAPPEL DE BIOSYNTHESE ET DE METABOLISME

Les hormones stéroïdes constituent un groupe homogène possédant toutes le squelette cyclopentenoperhydrophenanthrène. Il est admis que les étapes biosynthétiques initiales utilisent le cholestérol. Celui-ci est synthétisé dans les glandes productrices ou dans d'autres tissus, à partir des maillons acétate (Bloch, 1965) (10).

Ces étapes prennent place dans les glandes endocrines spécialisées, testicules, ovaires et cortex surrénal. Un tissu producteur particulier à la grossesse est représenté par le placenta.

Il est apparu que les tissus producteurs utilisent les mêmes étapes enzymatiques avec des différences seulement quantitatives, ces différences déterminant la spécialisation de ces tissus.

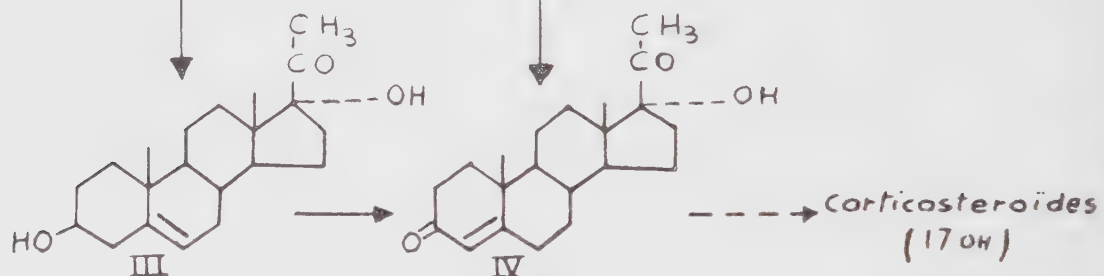
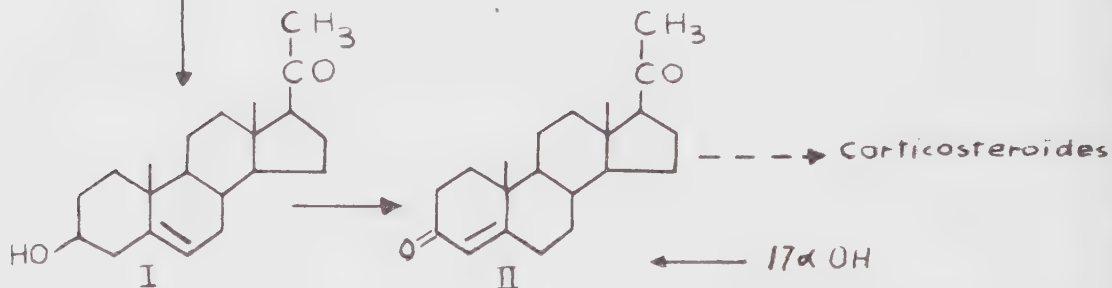
Très schématiquement, les filiations peuvent se représenter selon le schéma :

```
Cholestérol (C 27)
  ↓
Progestérone (C 21) → Corticostéroïdes (C 21)
  ↓
Androgènes (C 19)
  ↓
Oestrogènes (Phénolstéroïdes) (C 18)
```

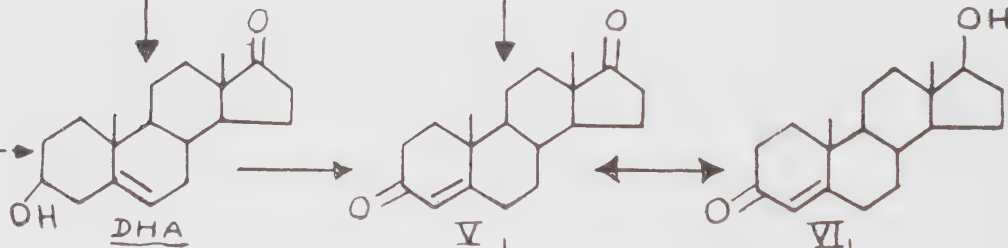
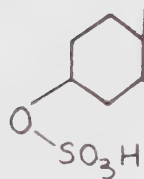

Acetate

Cholesterol

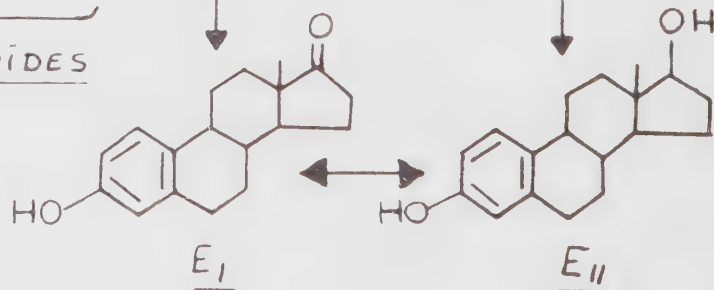
VOIE des Δ^4 STEROÏDES



sulfate de
DHA
(forme
circulante)



VOIE des Δ^5 STEROÏDES



Le tronc biosynthétique, commun sur le plan qualitatif, est schématisé par le tableau I.

L'étape première de la synthèse est la scission de la chaîne latérale du cholestérol. Le cholestérol est tout d'abord hydroxylé en positions 20α et 22. Une 20-22 desmolase provoque une coupure de la chaîne latérale, libérant l'aldéhyde isocaproïque d'une part, et d'autre part la prégnénolone (composé I, tableau I). La prégnénolone apparaît dans tous les tissus producteurs, comme le point de départ de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux.

Ces étapes sont strictement localisées dans la mitochondrie et apparaissent comme capitales quant à la régulation de la stéroïdogénèse par les hormones polypeptidiques d'origine hypophysaire (ACTH pour le cortex surrénal, FSH, LH, HCG pour les glandes sexuelles).

La prégnénolone doit sortir de la mitochondrie pour subir une hydroxylation en 17α (composé III, 17α hydroxy-prégnénolone). Cette hydroxylation est l'étape indispensable préalable pour l'action d'un 17,20 desmolase qui donne ainsi la série Androstane. L'ensemble de cette chaîne conserve la structure Δ^5 3β OH du cholestérol (voie des Δ^5 stéroïdes).

Ces composés peuvent tous subir l'action d'un système enzymatique cytoplasmique, réalisant l'isomérisation Δ^5 - Δ^4 (isomérase) et simultanément l'oxydation de l'hydroxyle en 3β (3 β hydroxystéroïde deshydrogénase). Ainsi, sont obtenues les structures Δ^4 3 céstéroïdes, communes à pratiquement toutes les hormones biologiquement actives (progestérone: II, 17α OH progestérone : IV, androstènedione : V). Ces trois composés sont également reliés par les étapes de 17α hydroxylation et de coupures de la chaîne latérale.

.La progestérone peut être considérée comme une véritable plaque tournante de l'ensemble de la stéroïdogénèse. Elle est un produit de sécrétion pour l'ovaire, le placenta,

mais aussi le point de départ de la synthèse des corticostéroïdes, non hydroxylés en 17α . Ceux-ci représentent la série des minéralocorticoïdes, hormones de régulation du métabolisme hydro-minéral. Des hydroxylases spécifiques réalisent les produits biologiquement actifs.

La 21 hydroxylation (microsomiale) de la progestérone conduit à la désoxycorticostérone (DOC). Celle-ci peut être hydroxylée en 11β par un système enzymatique mitochondrial et donne la corticostérone (composé B de Reichstein). A partir de la corticostérone, l'hydroxylation en 18, également mitochondriale, suivie d'une deshydrogénation, conduit au minéralocorticoïde le plus actif : l'aldostérone. Ces hydroxylations en 21, 11, 18 sont caractéristiques du cortex surrénal.

. La 17 α hydroxyprogestérone subit les mêmes types d'hydroxylations pour délivrer les corticostéroïdes 17α hydroxylés, hormones de régulation du métabolisme des protéines et des glucides (glucocorticoïdes). L'hydroxylation en 21 donne le composé S de Reichstein (11 déoxycortisol). Celui-ci, hydroxylé en 11β donne le cortisol, glucocorticoïde prédominant chez l'homme (composé F de Reichstein ou hydrocortisone).

A partir de la corticostérone et du cortisol, un système de 11 hydroxystéroïde deshydrogénase, non limité aux tissus stéroïdogéniques, réalise les transformations réversibles :

Corticostérone $\leftrightarrow$ 11 déhydrocorticostérone (composé A)

Cortisol $\longleftrightarrow$ Cortisone

La série des androstanes correspond aux stéroïdes d'action androgénique.

. D.H.A. : elle est également sécrétée par le cortex surrénal en quantité importante sous forme de son sulfate en 3, qui représente une forme circulante du stéroïde, retrouvée dans l'élimination urinaire.

. L'androstènedione, par action d'une 17β hydroxystéroïde deshydrogénase, donne, particulièrement dans les testicules, l'hormone mâle par excellence : la testostérone. La catégorie des oestrogènes est produite de façon quantitativement importante, seulement dans l'ovaire et le placenta. Un système enzymatique complexe, qui comporte une hydroxylation en C 19 réalise un cycle A phénolique (phénolstéroïdes) à partir des hormones mâles actives : androstènedione et testostérone, dont l'arômatisation donne respectivement l'oestrone (E_1) et l'oestradiol (E_2). Le métabolisme de ces stéroïdes phénoliques peut être étudié par la méthode que nous présentons. Nous nous sommes limités à l'étude du métabolisme des stéroïdes neutres.

Le schéma de biosynthèse nous sera une référence constante dans l'interprétation des étapes métaboliques. L'existence d'un tronc de biosynthèse commun aux divers tissus stéroïdogéniques permet en effet de comprendre diverses altérations du métabolisme (ex : production excessive de testostérone par l'ovaire). L'élucidation des mécanismes enzymatiques a fait de gros progrès. Le rôle des hydroxylases apparaît fondamental pour conférer l'activité spécifique aux produits synthétisés. Le mécanisme de fonctionnement est actuellement l'objet de nombreuses études. En recherche métabolique, nous verrons l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines hydroxylases ; il existe également des déficits congénitaux de certaines de ces hydroxylases dont nous avons pu étudier quelques exemples.

METABOLISME PERIPHERIQUE ET ELIMINATION

Libérés des glandes productrices, les stéroïdes actifs se répartissent dans l'organisme, exercent leur action spécifique sur leurs tissus cibles, sont inactivés principalement au niveau du foie et finalement éliminés principalement dans l'urine et sous forme de conjugués hydrosolubles.

. Le catabolisme est particulièrement actif au niveau du foie et l'inactivation est réalisée de façon générale par des réductions ; ainsi apparaît la possibilité de production d'isomères qui multiplient le nombre de métabolites à partir d'un seul stéroïde actif. La spécificité des diverses réductases impliquées entraîne cependant des orientations prédominantes. Ainsi, l'androstènedione conduit aux produits de réduction 5α et 5β . Chacun des isomères peut être réduit en 3α ou 3β , en 17α ou 17β . Cependant, la voie de réduction majeure produit principalement les formes 3α hydroxy, 5α androstane 17 one (androstérone) et 3α hydroxy, 5β androstane 17 one (étiocholanolone) que nous retrouverons comme forme principale d'élimination.

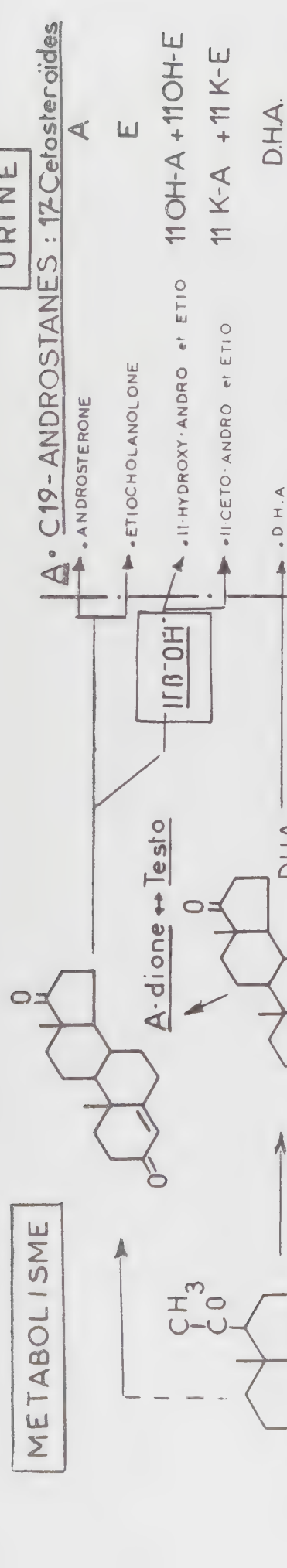
Le nombre des métabolites augmente avec le nombre des groupements fonctionnels. ainsi, les corticostéroïdes actifs donneront de ce fait des métabolites dihydrogénés, tétrahydrogénés sur le noyau A ou divers isomères totalement réduits (cortols). Ce métabolisme périphérique est en fait plus complexe par le fait des possibilités d'interconversion (androstènedione, testostérone) ou de transformations (corticostéroïdes en C 21, 17 hydroxylés donnant des androstanes 17 cétoniques, 11 oxygénés).

. La conjugaison. L'élimination en majorité urinaire de ces métabolites est facilitée par la conjugaison des stéroïdes avec des composés ionisables les rendant hydrosolubles. Des systèmes enzymatiques de glucuro- et de sulfo-conjugaison, surtout hépatiques, sont capables de réaliser des liaisons osidiques avec l'acide glucuronique, et des liaisons

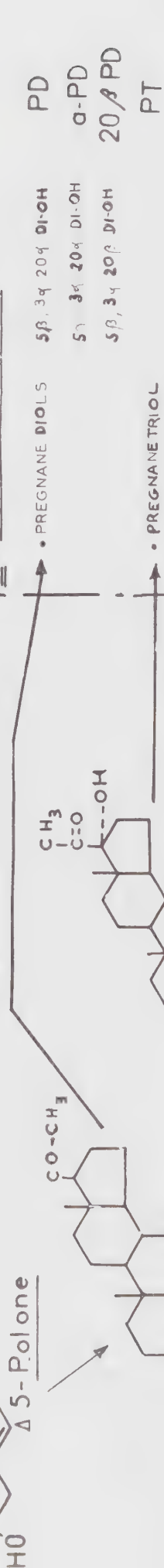
METABOLISME

URINE

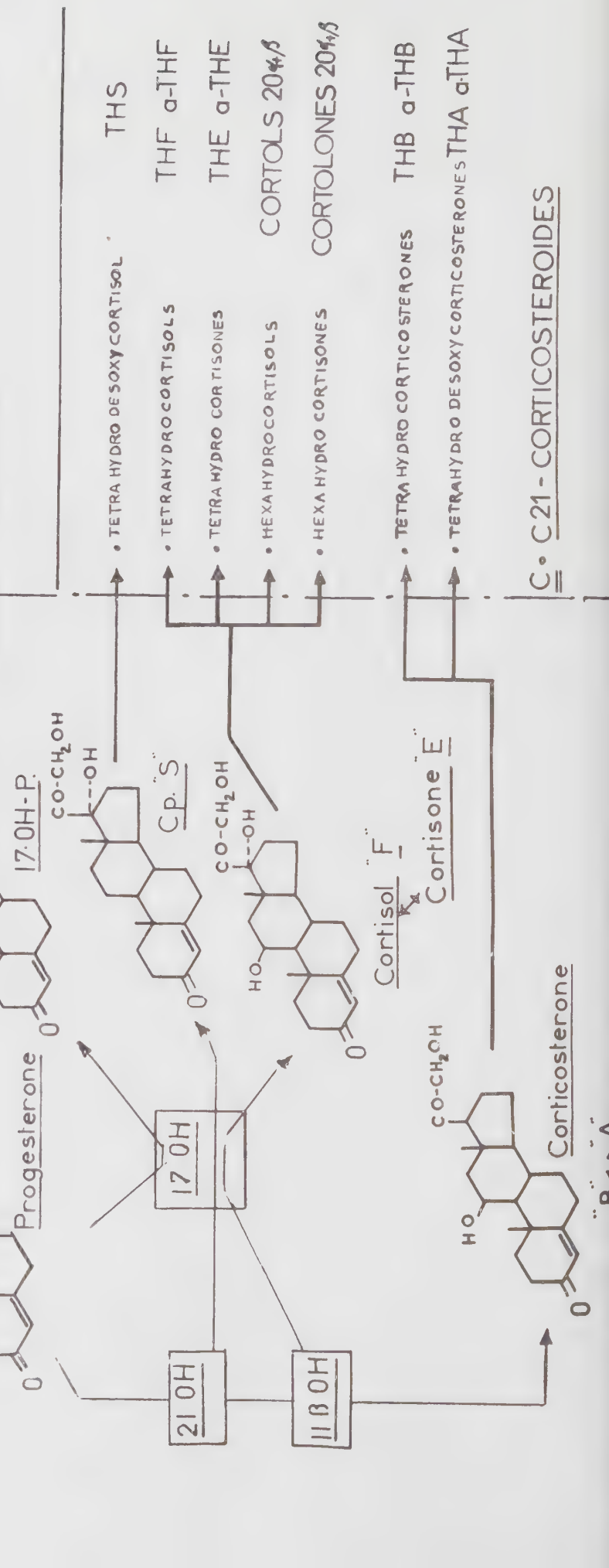
A. C19- ANDROSTANES : 17-Cetostéroïdes



B. C21- PREGNANES



C. C21- CORTICOSTEROIDES



ester avec l'acide sulfurique. Ces conjugués constitueront la forme primordiale d'élimination urinaire, et la première étape de l'analyse des métabolites débutera par le clivage de cette conjugaison.

Les détails de ces mécanismes de biosynthèse, de métabolisme et de conjugaison, peuvent être trouvés dans les revues traitant spécialement ce sujet (5, 16, 29, 33, 38, 42, 51, 84). Les grandes voies métaboliques des stéroïdes hormonaux sont résumées dans le tableau II.

GENERALITES SUR LES METHODES D'EXPLORATION

L'exploration et l'étude de la sécrétion stéroïdienne peut se faire à plusieurs niveaux :

- . au niveau de la biosynthèse, par l'étude in vivo ou in vitro de la production ;

- . au niveau des formes circulantes actives.

La forme circulante active est présente dans le sang à des taux souvent très bas (de l'ordre du microgramme ou du nanogramme pour 100 ml).

- . au niveau des métabolites excrétés, plus particulièrement dans l'urine où ils se retrouvent à des taux divers qui vont de plusieurs milligrammes par 24 heures (ex : androstérone) à quelques microgrammes par 24 heures (métabolites de l'aldostérone). Cette diversité de taux guide le choix méthodologique. Il est ainsi exclu que l'on puisse doser les métabolites de l'aldostérone par une méthode estimant également les métabolites des androgènes.

Malgré cette diversité, les problèmes posés sont communs, quels que soient les niveaux d'étude considérés. Il s'agit toujours de mélanges biologiques complexes dans lesquels les stéroïdes se trouvent présents avec les autres constituants du milieu étudié.

La méthodologie analytique a profité des progrès des techniques physico-chimiques. L'activité biologique a été l'un des premiers moyens d'estimation. La découverte de réactions chimiques faisant intervenir des groupes fonctionnels, a permis la détermination de groupes. C'est le cas de la réaction de Zimmerman caractéristique de groupements cétone adjacents aux groupements CH_2 , la réaction de Porter et Silber, caractéristique des groupements 17,21 OH, 20 cétoniques. Mais l'étude détaillée du métabolisme nécessite l'atteinte des métabolites individuels ou des groupes significatifs de métabolites.

Dans ce but, toutes les méthodes actuelles de séparation sont utilisées, en particulier les techniques chromatographiques (couche mince, chromatographie sur papier ou sur colonne), la dernière en date étant la chromatographie en phase gazeuse.

Deux voies sont donc possibles pour l'étude du métabolisme : soit rechercher à doser un seul métabolite,

soit rechercher une méthode d'étude qui permettra la séparation d'un maximum de métabolites principaux.

Cette dernière optique nous a paru particulièrement intéressante, comme méthode de recherche, permettant d'avoir une vue d'ensemble du métabolisme à travers l'excrétion urinaire.

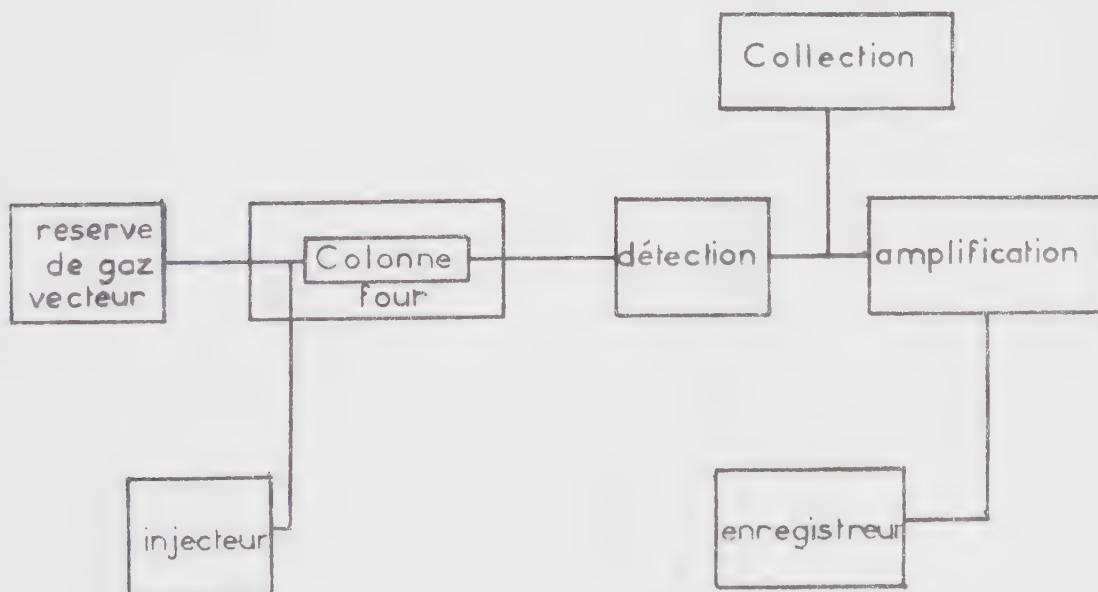
CHAPITRE II.

MATERIEL ET METHODES

I - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La notion de chromatographie gaz-liquide a été introduite par Martin et Synge en 1941.

Un système d'analyse gaz-liquide peut être illustré schématiquement par la figure 1.



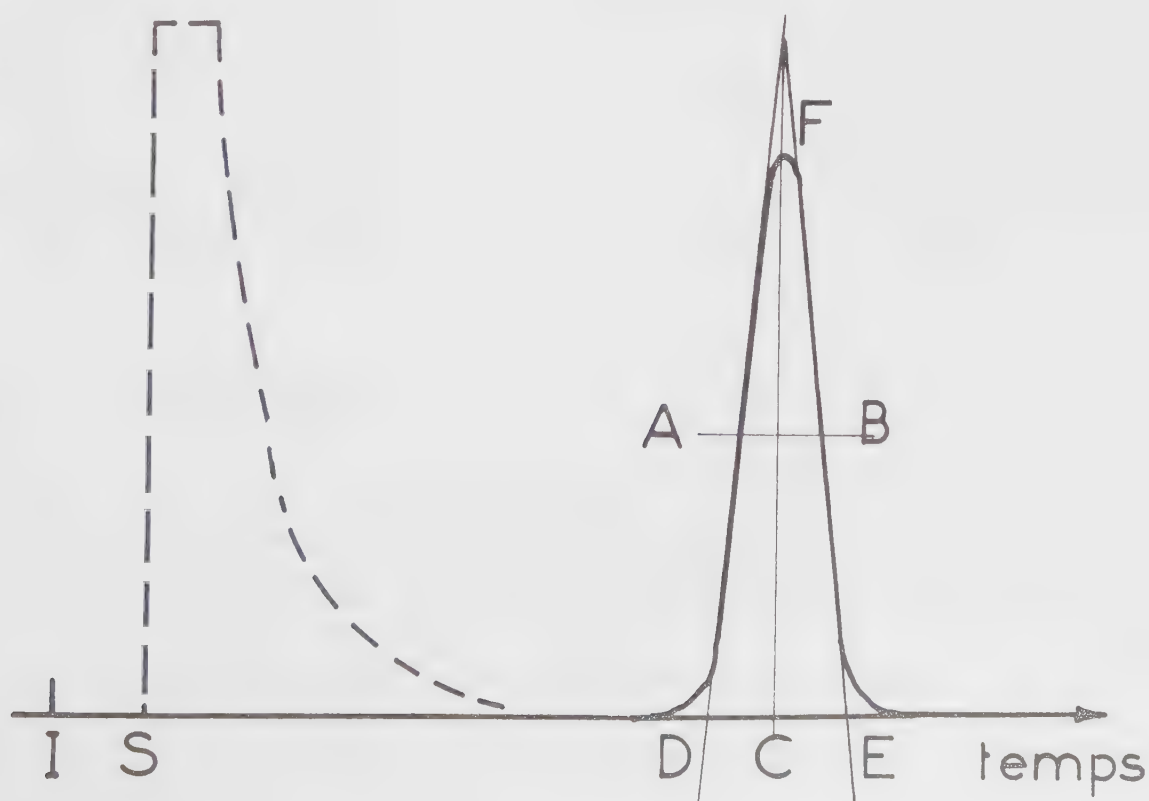
L'"âme" du système est constituée par une colonne capillaire ou remplie contenant la phase stationnaire, parcourue par un gaz vecteur.

Les colonnes capillaires ont généralement un diamètre intérieur de 0,25 mm pour une longueur moyenne de 50 à 60 mètres. La phase liquide est déposée sur les parois internes de la colonne sous forme de film de quelques microns d'épaisseur.

Les colonnes remplies sont beaucoup plus courtes (2 à 4 mètres) pour un diamètre intérieur de 3 à 4 mm. Dans ce type de colonne, la phase stationnaire est uniformément répartie en film, sur un support inerte de nature granulaire.

Le mélange à analyser, introduit par le système d'injection, est élué en ses constituants, selon leur tension de vapeur et leur coefficient de partage vis-à-vis de la phase stationnaire.

A la sortie de la colonne, les composés séparés traversent un système de détection qui réagit à la présence du composé dans le gaz vecteur. Le signal obtenu est enregistré sous forme d'un pic dont l'aspect théorique, gaussien, est illustré par la figure 2.



Sur ce type d'enregistrement, peuvent être définis :

1. volume de rétention VR

C'est la quantité moyenne de gaz vecteur ayant traversé la colonne jusqu'à l'apparition du soluté. Toute chose étant égale, le volume de rétention est caractéristique d'un soluté. Ce volume de rétention est directement proportionnel au temps de rétention.

2. temps de rétention

C'est le temps séparant l'injection du composé de l'apparition du sommet du pic du soluté. Sur la figure 2, il est donné par la distance IC. En pratique, il se mesure par la distance, front de solvant-sommet du pic (distance SC).

ASPECT QUALITATIF DU CHROMATOGRAMME

En pratique, la forme idéale gaussienne d'un pic doit être recherchée. Le soluté, pendant son cheminement le long de la colonne, se partage entre la phase fixe et la phase mobile. Le coefficient de partage entre ces deux phases est déterminant, mais il entre également en jeu, une notion de diffusion à travers le film liquide, et de diffusion entre les grains du support. Il est souhaitable de se trouver dans le cas d'un soluté donnant avec la phase stationnaire un isotherme linéaire. Ceci se traduira par le choix d'une phase stationnaire adaptée au type de composés à séparer.

RESOLUTION

La théorie des plateaux a été appliquée à une colonne de chromatographie gaz-liquide (Martin, Synge, Giddings) et permet de définir un pouvoir de résolution. L'efficacité d'une colonne est donnée par son nombre de plateaux théoriques. Il peut s'exprimer sous la forme

$$n = 5,545 \left(\frac{dR}{s} \right)^2$$

dans laquelle dR = distance de rétention du composé
 s = largeur du pic à mi-hauteur.

Les colonnes remplies, satisfaisantes, devront présenter en moyenne 1200 plateaux théoriques par mètre. Ceci conduit à l'allongement de la colonne, compatible avec une perte de charge tolérable. Nous avons utilisé des colonnes remplies d'une longueur de 4 mètres.

La théorie cinétique considère de plus les phénomènes de diffusion accompagnant le passage du composé à travers la colonne. La théorie cinétique, mettant en jeu les différents paramètres conditionnant le cheminement d'un soluté à travers la colonne a été formulée par Van Deemter, et peut s'écrire sous la forme

$$h = A + \frac{B}{U_m} + C U_m$$

dans laquelle : h = hauteur équivalente à un plateau théorique.

A = diffusion turbulente, liée au garnissage de la colonne.

B = diffusion moléculaire, liée à la régularité du remplissage.

C = résistance au transfert de masse, liée au coefficient du partage, et à l'épaisseur de la phase stationnaire enrobant les grains du support.

U = débit du gaz vecteur.

Cette équation peut se représenter par la courbe de la figure 3.

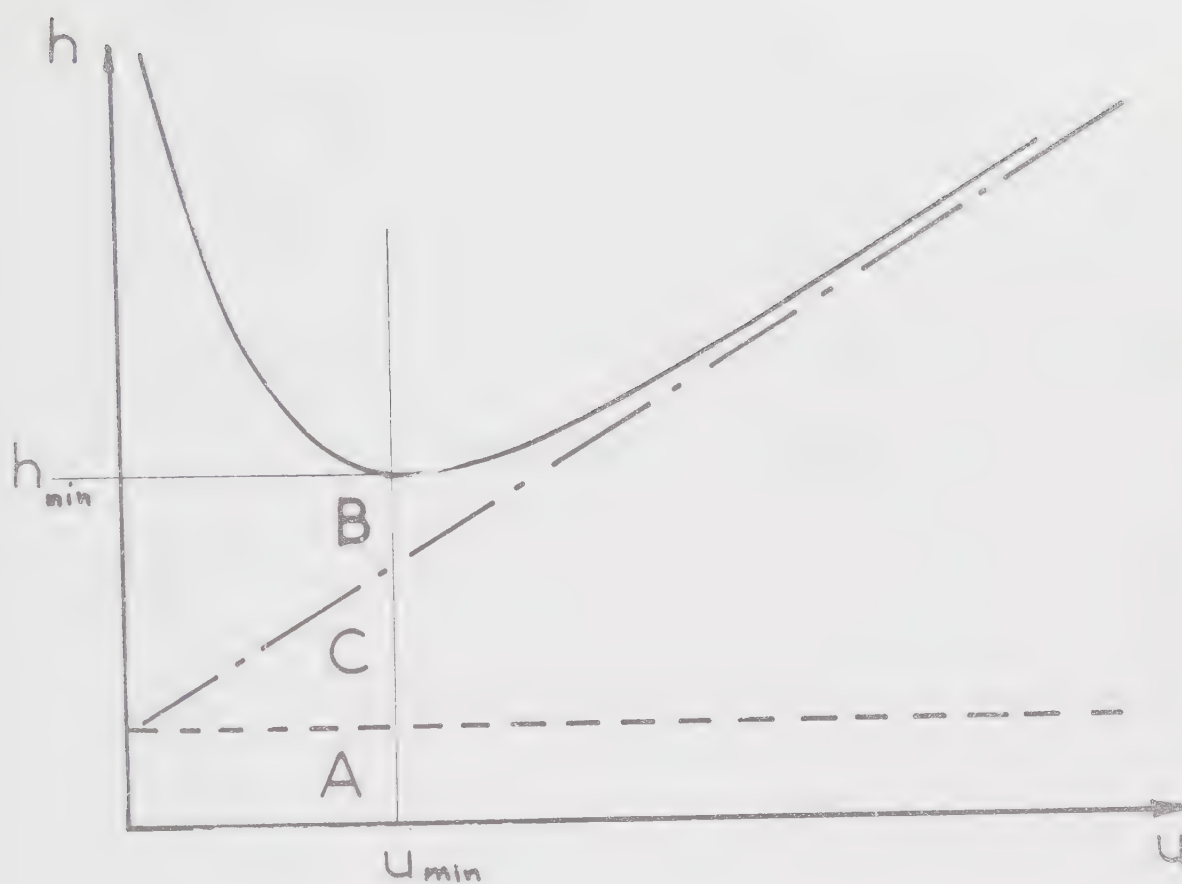


Figure 3.

Elle met en évidence les facteurs dont il faut tenir compte en pratique pour l'obtention d'une colonne donnant des résultats optimum : support, granulométrie (la plus fine et la plus étroite possible, d'où tamisage), remplissage régulier et réduction du volume mort. Les conditions pratiques de réalisation seront décrites dans le chapitre matériel et méthodes.

EVALUATION NUMERIQUE DES PARAMETRES DE RETENTION

1. Séparation isotherme

En 1962, Purnell (77) a montré qu'à température constante, les composés formant une série homologue, étaient élués selon le nombre de leurs atomes de carbone, en fonction du logarithme de leur volume de rétention (figure 4).

Diverses modalités ont été utilisées pour présenter les temps de rétention :

. Il est parfois exprimé en minutes.

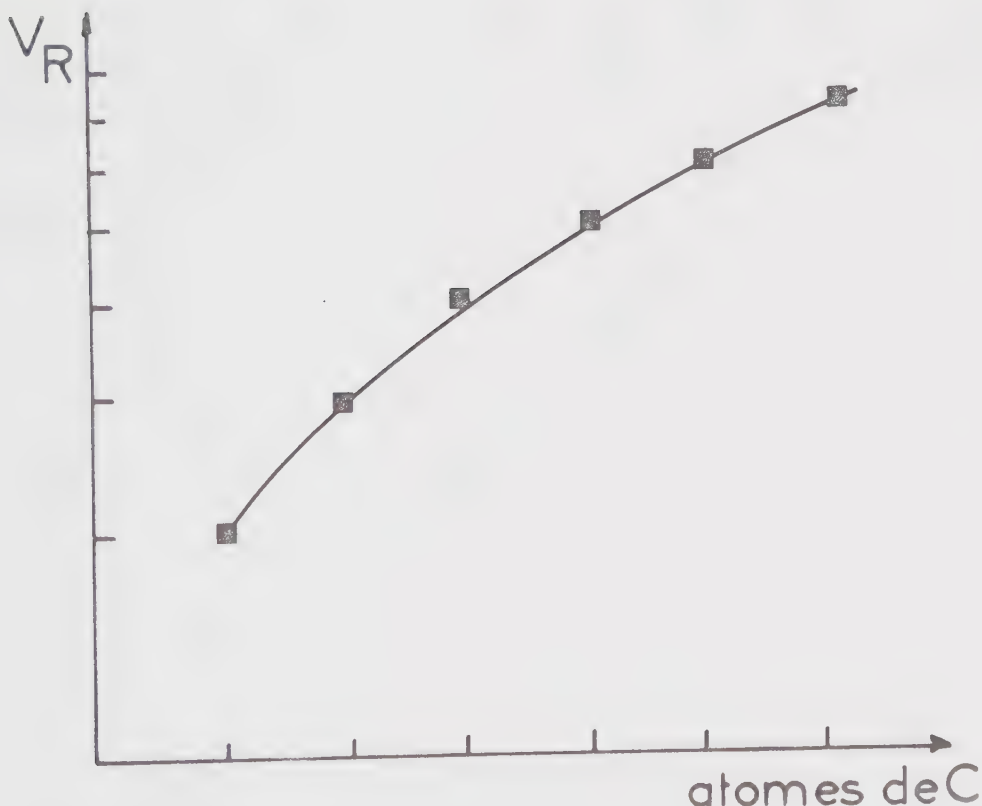


Figure 4.

Une très nette amélioration a été apportée par l'évaluation d'un temps de rétention relatif à un standard. Malgré cela, il n'est pas possible de donner une valeur chiffrée à un temps de rétention qui soit reproductible, soit avec un appareillage différent, soit avec des valeurs obtenues dans d'autres laboratoires.

. En 1962, Vandenneuvel et Horning (94), proposèrent comme échelle de référence le "Steroid Number" (SN) définie en attribuant les valeurs 19 et 27 au 5α Androstane et 5α Cholestane. Cette méthode permet d'attribuer à chaque groupe fonctionnel un incrément de rétention dont les valeurs sont additives, introduisant ainsi un élément intéressant d'analyse structurale.

2. Séparation en programmation de température

En programmation linéaire de température, on a montré que les membres successifs d'une série homologue sont élués à intervalles réguliers, donc que leur temps de rétention est une fonction linéaire du nombre de leurs atomes de carbone (figure 5).

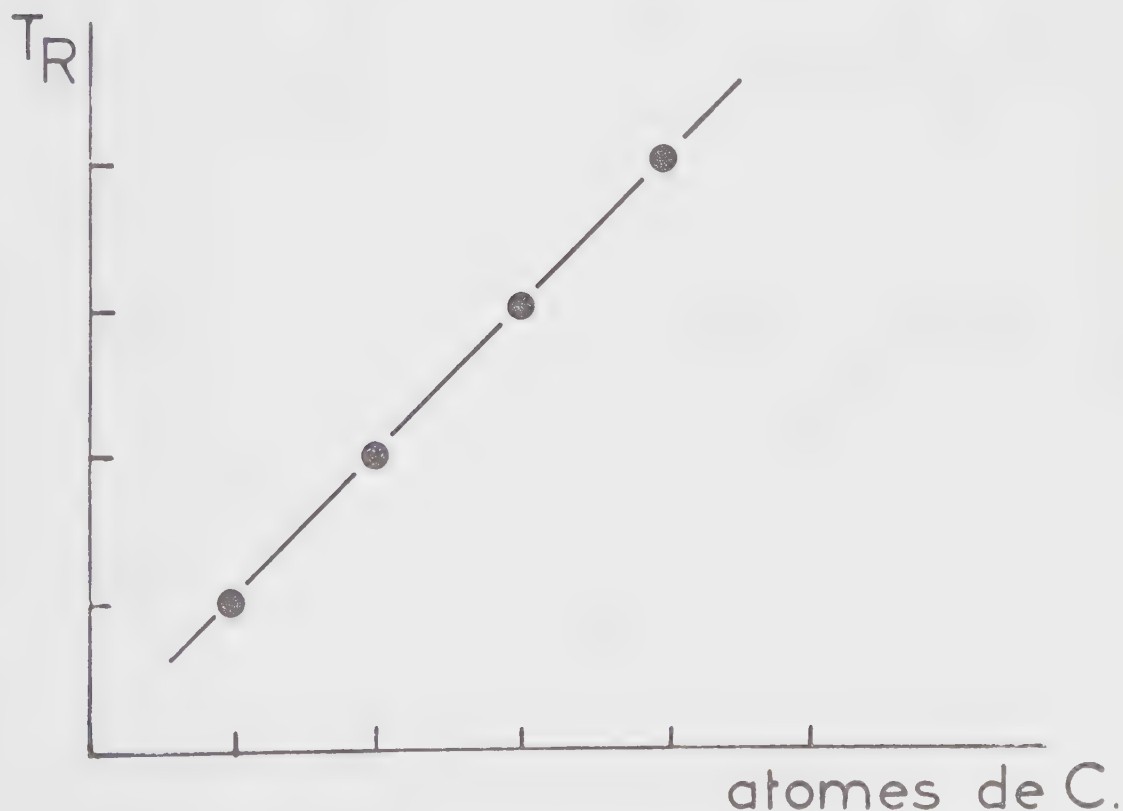


Figure 5.

Cette propriété extrêmement intéressante permet donc d'apporter un élément chiffré, facilement calculable, à l'identification d'un composé, par l'établissement d'une

échelle de mesure ne dépendant que de la phase stationnaire utilisée.

a - indice de rétention

Introduit en 1958 par Kovats, cet indice de rétention prenait comme référence la série des n-alcanes, $C_n H_{2n+2}$. Les points de l'échelle de référence sont fixés pour l'alcane $C_x H_{2x+2}$ comme étant égal à 100 x. En température programmée, il suffit de tracer la courbe : temps de rétention, fonction du nombre d'atomes de carbone ; le temps de rétention pouvant être exprimé en cm, il suffit pour tracer cette courbe d'étalonnage, d'un double-décimètre. Un composé A aura ainsi un indice de rétention défini par interpolation linéaire entre 2 alcanes, encadrant ce composé.

b - unités de méthylène (UM)

Dans le domaine de l'analyse des stéroïdes, le groupe de Horning (93) introduisit l'unité de méthylène, définie comme étant l'indice de rétention divisé par 100. L'utilisation des UM et SN a permis de montrer (95) les propriétés polaires du squelette stéroïde, en chromatographiant la série 5 α des androstane, prégnane et cholestane (figure 6).

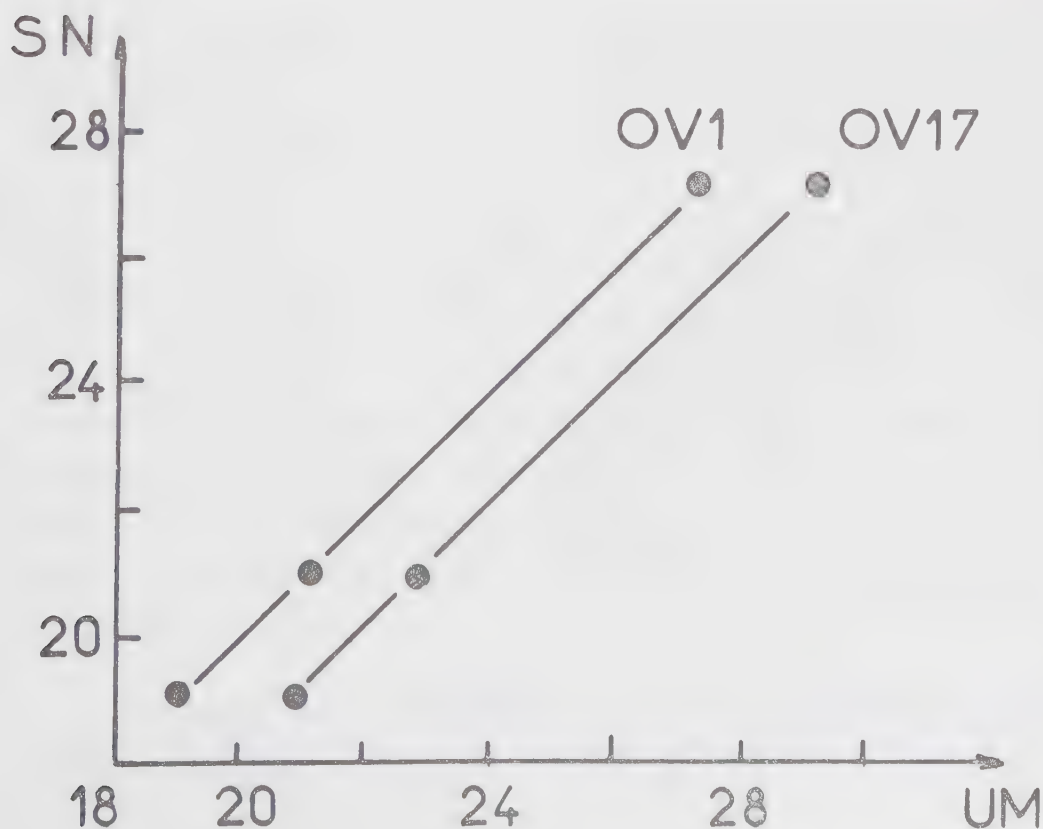


Figure 6.

Dans ce travail, nous avons utilisé exclusivement la programmation linéaire de température ; les paramètres de rétention ont été exprimés sous forme d'unités de méthylène.

II - COMBINAISON CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE-SPECTROMETRIE DE MASSE

Pendant de nombreuses années, la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, évoluèrent parallèlement dans le domaine de la méthodologie analytique. Ces deux techniques avaient cependant 2 points communs importants : le fonctionnement en phase gazeuse, et la faible quantité de composés requis pour l'analyse.

De plus, la spectrométrie de masse, nécessite pour identifier un composé, une purification poussée de celui-ci, purification que réalise avec une bonne résolution, la chromatographie en phase gazeuse.

Le principe de la combinaison est donc séduisant. Cependant, dans le cas où le chromatographe utilise des colonnes remplies, le gaz vecteur, mélangé à l'éluat, émerge dans la colonne à une pression voisine de 1 bar pour un débit de l'ordre de 40 ml/mn. Le spectromètre de masse, par contre, nécessite un vide de fonctionnement de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} mm de mercure. Le couplage suppose donc l'épuration des éluats de la colonne, du gaz vecteur. Ce problème se pose en des termes beaucoup plus simples, dans le cas des colonnes capillaires dans lesquelles, le débit gazeux est beaucoup plus faible. Par ailleurs, le couplage suppose également que les molécules à analyser ne soient ni dégradées, ni perdues.

Ce problème est résolu par des séparateurs moléculaires ou enrichisseurs, dont il existe plusieurs types.

Le séparateur, type RYHAGE (83) utilise dans son principe de fonctionnement, la différence d'énergie cinétique

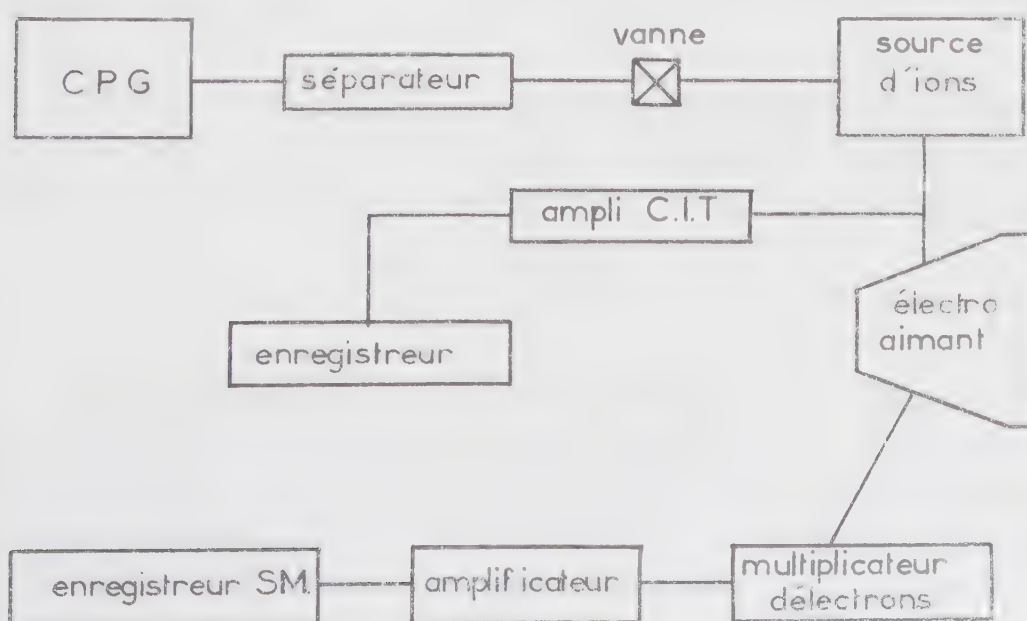
entre les molécules du gaz vecteur et celles des composés élués en sortie de colonne, par passage à travers des buses de très faible diamètre.

Le séparateur type WATSON-BIEMANN (97), utilise la différence de taille entre ces molécules et réalise la séparation par passage du mélange gazeux à travers une paroi en matériau fritté (verre ou métal). Les molécules du gaz vecteur traversent cette paroi, tandis que les grosses molécules sont retenues.

Le séparateur décrit par LLEWELYN (67), utilise le principe de la diffusion des molécules organiques à travers une membrane de polymère de silicone.

Ces divers séparateurs ont des caractéristiques d'enrichissement et de rendement voisines (50 à 75 % de rendement pour un coefficient d'enrichissement de 100 à 150). Ces caractéristiques peuvent cependant varier dans le cas des molécules polaires, tel que les stéroïdes où les phénomènes d'adsorption ou de dégradation peuvent être importants.

Une combinaison peut être représentée schématiquement par la figure 7.



La partie spectromètre de masse peut utiliser divers types d'ionisation et de déflexion des ions formés. Cependant, de manière la plus courante, l'ionisation est réalisée par bombardement électronique, et la séparation des ions est basée sur le principe de la déviation de la trajectoire, d'une particule électrique, soumise à l'influence d'un champ magnétique.

Dans la source d'ion, les molécules subissent un bombardement électronique et sont ionisées. L'ionisation la plus facile est réalisée par arrachement d'un électron à un hétéro-atome, donnant ainsi naissance à l'ion moléculaire. L'excès d'énergie absorbée par la molécule est dissipée par fragmentation. Cette fragmentation dépend de l'énergie de bombardement, mais est orientée par la structure de la molécule.

Ces ions sont accélérés le long du tube analyseur, par l'action d'une forte différence de potentiel (2000 à 4000 volts). A la sortie de la source, environ 10 % des ions émis sont collectés, fournissant ainsi le courant d'ionisation totale (CIT). Ce courant permet d'obtenir le tracé de l'analyse chromatographique, après passage dans le séparateur.

Le faisceau d'ions traverse alors un champ magnétique et leur trajectoire est déviée en fonction du rapport m/e , m étant leur masse ; e , leur charge.

La relation liant le champ magnétique H au voltage d'accélération V et à m/e permet d'assigner un rayon de courbure r , à un ion de masse m et de charge e donné, selon :

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 R^2}{2V}$$

Un balayage du champ magnétique de 0 à $H_{\max}$ permettra donc de collecter au bout d'une trajectoire parfaitement déterminée, la totalité des ions émis par la source. La relation liant H à m/e étant linéaire pour V et r constant, on voit que l'on peut étalonner le champ magnétique en unité de masse.

L'impact des ions sur le collecteur, après amplification, est enregistré sur un dispositif galvanométrique à défilement rapide, pour donner le spectre de masse.

Un spectre de masse se présente donc sous la forme d'une série de pics, dont la hauteur est proportionnelle à l'abondance des ions qu'ils représentent, et le nombre, à la qualité de la fragmentation. En effet, un bombardement des molécules à faible énergie ne provoquera que l'ionisation de celles-ci et une fragmentation très limitée. Ceci peut être un moyen de caractériser l'ion moléculaire, dans le cas des molécules particulièrement fragiles. Dans ce cadre, les développements récents de l'ionisation chimique, apparaît comme une méthode de grand intérêt.

D'une façon générale, l'augmentation de l'énergie de bombardement, provoque un déplacement de la densité des pics du spectre, vers la zone des faibles masses. Inversement, la diminution de cette énergie, la déplace vers la région des hautes masses. L'obtention d'un spectre de masse, nécessitera donc parfois plusieurs passages à des énergies de bombardement différents.

L'identification des masses, sur le spectre peut se faire à l'aide d'un marqueur de masse, dispositif permettant l'établissement d'une échelle de masse, simultanément au balayage du champ magnétique. L'étalonnage des masses est généralement réalisé par le spectre de perfluorokérosène (PFK) dont la fragmentation donne naissance à des ions de masses connues ($\text{CF}_3 = 69$; $\text{C}_2\text{F}_5 = 119$; $\text{C}_3\text{F}_7 = 169$; etc...). Cette opération est facilitée dans les appareils à double faisceau.

L'utilisation du marqueur de masse ne dispense d'ailleurs pas de l'étalonnage du PFK, l'échelle des masses n'étant pas parfaitement linéaire sur la totalité de l'intervalle des masses.

La caractéristique fondamentale d'un spectromètre de masse est son pouvoir de résolution. Il est donné par la relation

$$R = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

On dit que 2 pics sont "résolus" lorsque la vallée entre eux ne dépasse pas un certain pourcentage des pics eux-mêmes. Généralement, la résolution est considérée pour une vallée de 10 %.

Les valeurs de R peuvent aller de 1000 (basse résolution) à 50000 (haute résolution), le choix de telle ou telle résolution étant dicté par le problème à résoudre.

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un appareil de performance moyenne (LKB 9000). La résolution est de 1200, ce qui permet l'identification aisée de masses nominales allant jusqu'à 900 ou 1000.

APPLICATION A L'ANALYSE DES STEROIDES HORMONAUX

Les stéroïdes hormonaux sont des substances de poids moléculaire relativement élevé. La présence de groupements fonctionnels pouvant être nombreux, il se pose un certain nombre de problèmes : volatilité réduite, possibilité de dégradation à haute température. De plus, certains d'entre eux présentent une chaîne latérale particulièrement thermolabile (corticostéroïdes).

En 1959, un certain nombre de substances ayant un point d'ébullition voisin de celui des molécules stéroïdiennes, purent être analysées par chromatographie en phase gazeuse. Ce furent principalement la séparation chromatographique d'acides gras, sous forme de méthyl-esters.

C'est vers la fin de 1959 que plusieurs auteurs (8, 32) montrent la possibilité de séparation des stérols en phase

vapeur. Puis en 1960, parurent les premiers mémoires concernant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, des hormones stéroïdes. Ces travaux furent menés indépendamment par Van den Heuvel (91) qui chromatographia des dérivés de l'androstane et du prégénane, par Wotiz et Martin (99), proposant la séparation, l'identification et la quantification des 3 principaux oestrogènes et par Chen et Lantz (25) utilisant à la fois des colonnes remplies et des colonnes capillaires, pour la séparation des stéroïdes.

Ce succès limité à des stéroïdes mono ou dioxygénés était basé sur l'inactivation des colonnes et des supports et l'utilisation de très faibles pourcentages de phase stationnaire thermostable (polymère de silicone).

Le groupe de Horning, plus particulièrement, s'est depuis lors attaché à étendre cette méthode à l'ensemble des structures stéroïdes d'intérêt biologique. Ceci était possible grâce au développement de dérivés particuliers, neutralisant les groupes fonctionnels. Une nouvelle chimie s'est développée sur ces bases concernant en particulier les dérivés triméthylsilyléthers décrits par Langer (63) et appliquée aux stéroïdes hormonaux par Horning (72). L'étude détaillée des réactions de silylation, de leur cinétique en fonction de la stéréochimie, et la stabilité des produits réactionnels (18, 19, 20) permit d'en définir les conditions d'utilisation.

D'autres types de dérivés s'adressant aux groupements cétones ou hydroxyles, ont également été introduits. On dispose ainsi à l'heure actuelle de plusieurs possibilités rendant volatiles et thermostables pratiquement toutes les structures stéroïdes hormonales.

Il est intéressant de noter que ces divers dérivés peuvent être utilisés comme moyen de caractérisation de groupements fonctionnels par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse, ceci à l'échelle du microgramme, au même titre que des microréactions spécifiques.

La présence de ces dérivés sur les divers groupes fonctionnels est également intéressante en spectrométrie de masse dans laquelle ils induisent des fragmentations caractéristiques. Ces propriétés (nécessité de faibles valeurs pondérales, fragmentation caractéristique) font de la combinaison chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse, un instrument particulièrement puissant, dans l'élucidation et la caractérisation des structures stéroïdes hormonales.

Enfin, l'utilisation de dérivés mixtes, tels les dérivés méthoxyamines-triméthylsilyléthers (MO-TMS) (41) a permis de stabiliser certaines structures, telles les chaînes dihydroxyacétoniques, instables en chromatographie en phase gazeuse.

Dans cette étude, nous avons utilisé ce genre de dérivés que nous discuterons au chapitre IV.

III - MATERIEL ET METHODES UTILISEES

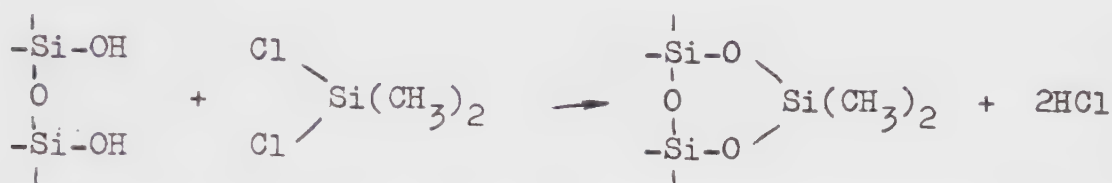
1. CHROMATOGRAPHIE

Le chromatographe utilisé est un Carlo ERBA, modèle GV équipé en double colonne et doté de 2 détecteurs à ionisation de flamme. Connecté à 2 enregistreurs, il permet l'obtention de 2 chromatogrammes simultanés.

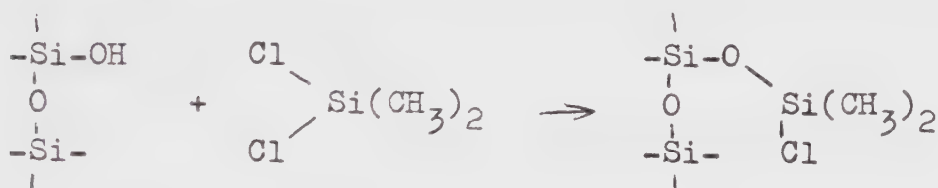
Les colonnes sont en verre, en forme de W, d'un diamètre intérieur de 3 mm, et d'une longueur de 4 mètres. La préparation de ces colonnes, leur remplissage, ainsi que le revêtement de la phase stationnaire sur le support, sont réalisés par nos soins.

a) Préparation de la colonne :

La colonne de verre doit être parfaitement désactivée pour éviter les phénomènes d'adsorption des stéroïdes, substances relativement "polaires" au contact de leur paroi. Pour cela, on utilise le diméthylchlorosilane (DMCS) qui réagit avec les groupements OH libres du verre, pour donner soit un éther diméthylsilyle, dans le cas de 2 groupements OH adjacents :



soit un éther chlorosilylé, dans le cas d'un groupe OH isolé :



Dans le dernier cas, l'éther chlorosilylé peut s'hydrolyser pour redonner un groupement OH libre. Un traitement au méthanol anhydre avec formation d'un dérivé méthoxy est alors nécessaire :



En pratique, le traitement est le suivant :

- Rinçage de la colonne avec du Toluène ;
- Remplissage de la colonne avec une solution de DMCS à 5 % dans le Toluène. Le contact est laissé pendant 2 heures.
- Vidange et rinçage de la colonne avec du Toluène ;
- Rinçage avec du méthanol anhydre, laissé en contact pendant 5 minutes.
- Rinçage à l'Acétone et séchage.

b) Préparation du support :

Le support le plus communément utilisé est la terre de diatomée. Elle se trouve dans le commerce, soit à l'état brut, soit désactivée après un tamisage plus ou moins poussé. L'obtention d'une bonne résolution étant conditionnée par une échelle de granulométrie très resserrée, il est nécessaire de traiter à nouveau ce matériau.

Nous avons utilisé le support, vendu sous le nom de "Gas Chrom P" (Applied Science), de granulométrie comprise entre 100 et 120 mesh, selon l'échelle de Tyler.

Ce support est lavé à l'acide chlorhydrique concentré, la potasse alcoolique, tamisé et désactivé avant d'être revêtu de la phase stationnaire.

Nous avons opéré de la façon suivante :

- Dans un bécher de 400 ml, est versé environ 100 g de GCP dans lequel est ajouté de l'acide chlorhydrique fumant. Après avoir mélangé avec précaution pour éviter le bris des particules, l'acide est décanté au bout d'une heure. On recommence alors l'opération en laissant l'acide en contact pendant 24 heures.
- L'acide est décanté et le GCP est lavé à l'eau désionisée jusqu'à neutralité du bain de rinçage.
- Après décantation, une solution de 5 % de Potasse dans du Méthanol est ajoutée et laissée en contact 2 heures.
- Rinçage à l'eau désionisée jusqu'à neutralité.
- Rinçage à l'acétone, et séchage à l'étuve à 80 ° pendant 4 heures.
- Le support, environ 30 g, est alors tamisé entre 2 tamis de maille 100 et 120 mesh, monté sur un bâti vibrant. Il est nécessaire de faire 3 tamisages successifs.

- Le support est alors désactivé à l'aide d'une solution de 5 % de DMCS dans le Toluène, selon un processus chimique identique à celui de la désactivation du verre. On procède comme suit :

- . Le support est versé en pluie dans une fiole à vide contenant la solution de DMCS.
- . Elimination des bulles d'air en appliquant le vide (trompe à eau).
- . Laisser en contact pendant 2 heures.
- . Filtration sur filtre Buchner à verre fritté, suivie immédiatement(en ne laissant pas le support à l'air libre) par un rinçage abondant au Méthanol.
- . Rinçage au Toluène et séchage à l'étuve à 100°C pendant 2 à 3 heures.

Ainsi préparé, le support est prêt à recevoir la phase stationnaire.

c) Garniture du support :

Nous avons utilisé principalement 2 phases différentes, l'une peu polaire OV-1, l'autre dite "polaire" OV-17 (Supelco). La garniture du support pour la phase stationnaire a été faite selon la méthode de filtration préconisée par Horning (48).

Nous avons utilisé un pourcentage faible de phase, 1 %.

Nous avons procédé comme suit :

- La phase stationnaire dissoute dans le solvant approprié (Toluène ou Chloroforme), à raison de 1,5 g de phase pour 150 ml de solvant, est versée dans une fiole à vide.
- Après chauffage à 80°C, le support est versé en pluie dans la solution.
- Après élimination des bulles d'air par mise sous vide de la fiole, le mélange est doucement agité pour assurer un bon contact.

- Laisser en contact pendant 2 heures ; le mélange est ensuite filtré sur Buchner à verre fritté.
- Lorsque la quasi totalité du solvant a traversé le filtre, le vide est appliqué pour sécher le support enrobé.
- Après démoulage, le support enrobé est étalé délicatement sur une surface propre (papier d'aluminium, ou plaque de verre) et mis à sécher à l'étuve à 100° pendant une nuit.

Il est alors vidé dans les colonnes à l'aide d'un petit entonnoir ; celles-ci sont mises à conditionner à 300°C pendant 24 heures dans le four du chromatographe, sous un faible courant d'azote.

d) Conditions opératoires :

Les analyses ont été menées en programmation de température dans les conditions suivantes :

- Température initiale	180°C
- Taux de programmation	1,2°C/mn
- Température finale	280°C
- Température de l'injecteur	220°C
- Température du détecteur	300°C
- Débit du gaz vecteur	30-40 ml/mn
- Débit de l'air	300 ml/mn
- Débit de l'hydrogène	30 ml/mn
- Déroulement de l'enregistrement	5 mm/mn
- Tension d'entrée de l'enregistreur	2,5 mV
- Durée de l'enregistrement	80-90 mn
- Atténuation de l'électromètre	$4 \cdot 10^{-10}$ Ampère
- Volumes injectés	3-5 μ l

L'injection se fait simultanément sur 2 colonnes garnies d'une phase polaire OV-17 et non polaire OV-1, permettant ainsi l'enregistrement simultané de 2 chromatogrammes d'un même mélange de stéroïde.

2. COMBINAISON CHROMATOGRAPHIE-SPECTROMETRIE DE MASSE

Nous ne disposons pas dans le cadre du laboratoire, de spectromètre de masse connecté au chromatographe en phase gazeuse. Néanmoins, il nous a été possible d'avoir accès à cet appareillage grâce à un contact permanent avec des laboratoires engagés dans cette méthodologie, Dr E.C. Horning à Houston (Texas) et Dr C.J.W. Brooks, Université de Glasgow (Ecosse).

L'appareillage utilisé est une combinaison chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse LKB, modèle 9000. Dans le laboratoire de E.C. Horning, cet appareil était connecté à un ordinateur PDP-12 permettant l'obtention de spectres avec suppression automatique du bruit de fond, et marquage de masse. Les spectres se présentaient alors sous forme de diagramme de barre.

L'appareillage est muni d'un séparateur type Ryhage. Le gaz vecteur du chromatographe est de l'Hélium. Les conditions opératoires étaient généralement les suivantes :

- Température du séparateur	250-270°C
- Energie de bombardement	70 eV
- Voltage d'accélération	3,5 KV
- Courant d'ionisation	60 uA
- Température de la source d'ions	250°C

Une énergie de bombardement de 12 ou 20 eV a été utilisée dans certains cas pour permettre une meilleure détermination de l'ion moléculaire.

Le spectre était obtenu sur un enregistreur galvanométrique. La durée d'enregistrement était de l'ordre de 5 à 9 secondes. Dans le cas de couplage avec ordinateur, le spectre était en même temps enregistré sur un système de bandes magnétiques.

3. SCINTILLATION LIQUIDE

Le comptage de radioactivité a été réalisé dans un spectromètre à scintillation liquide PACKARD, modèle 3320, "Tricarb". Il dispose de 3 canaux de comptage. Cet appareil dispose également d'un système pneumatique permettant l'introduction d'une bille de radium, sous la fiole contenant l'échantillon. Dans l'un des canaux de comptage attribué au "standard externe", est obtenu le nombre de coups par minute de cette bille de radium détectée à travers la fiole. Par étalonnage de l'appareil, avec des fioles contenant des quantités connues d'agent de "Quenching", on établit ainsi une courbe permettant de déterminer le rendement du comptage.

La solution scintillante utilisée est composée de 5,5 g de Permablend dissous dans 1 litre de Toluène. L'échantillon à "compter" est disposé dans une fiole, évaporé à sec, puis dissout dans 15 ml de solution scintillante. Le temps de comptage est de 10 mn. Les réglages sont les suivants :

<u>Canal ^3H</u> :	Gain	50 %
	Fenêtre	50-1000

<u>Canal "Standard Externe"</u> :	Gain	5 %
	Fenêtre	1000- ∞

Dans ces conditions, le rendement de comptage est de 35-40 %.

4. PREPARATION DE L'EXTRAIT BIOLOGIQUE

a) Recueil des urines

Les urines de 24 heures sont recueillies dans un bocal contenant 1 ml d'une solution à 0,1 ‰ de Merseptyl, et conservées à + 4°C. La prise d'essai correspond à 1/50 de la diurèse.

b) Hydrolyse

Si la majeure partie des métabolites neutres des stéroïdes urinaires est glucuroconjuguée, il n'en va pas de même pour la déhydroépiandrosterone (DHA) se trouvant dans les urines sous forme de sulfate. Il est donc nécessaire de procéder à une solvolysse des esters-sulfates si l'on veut obtenir un clivage quantitatif de la conjugaison de ce stéroïde.

L'hydrolyse des stéroïdes glucuro-conjugués se fait à l'aide de suc digestif d'*Helix Pomatia* contenant 100.000 unités de β glucuronidase (IBF, Gennevilliers), en milieu tamponné à pH 5,2.

Nous avons procédé comme suit :

- Amener le pH de la prise d'essai à pH 5,2 à l'aide d'acide acétique à 20 %.
- Ajouter 1/10 de volume de tampon acétate 2M, pH 5,2.
- Ajouter 1000 unités de glucuronidase par ml d'urine.
- Laisser incuber 18 à 24 heures à 37°C.

c) Extraction

A l'extrait urinaire est ajouté 1 ml d'une solution éthanolique de Tétrahydrocortisol tritié (THF ^3H) à 0,01 $\mu\text{Ci/ml}$. L'extraction se fait par 2 fois 150 ml d'un mélange Ether-Acétate d'Ethyle 8:2, dans des allonges cylindriques placées sur un extracteur rotatif pendant 45 minutes.

Après décantation de la phase aqueuse, le mélange éther-acétate d'éthyle est lavé par 2 fois 0,1 volume de soude normale pendant 15 minutes, puis 1 fois par 0,1 volume d'eau distillée.

La phase organique est filtrée dans un ballon à l'aide d'un papier filtre contenant du sulfate de soude

anhydre, puis évaporée à sec dans un évaporateur rotatif. L'extrait sec est repris dans 1 ml de Pyridine distillée et anhydre, dans un tube à vis, à capsule téflon et conservé au réfrigérateur.

La phase urinaire conservée est amenée à pH 1 avec de l'acide sulfurique, puis extrait par 2 fois 1 volume d'acétate d'éthyle dans des allonges cylindriques pendant 1 heure.

L'acétate d'éthyle est alors placé pendant 15 heures dans un bain-marie à 37°C pour procéder à la solvolysé des éthers-sulfates. Après solvolysé, l'acétate d'éthyle est lavé par 2 fois 0,2 volume de soude normale, filtré et évaporé à sec dans un évaporateur rotatif. L'extrait sec est repris dans un tube, col à vis, bouché au téflon.

Cet extrait est alors mélangé au précédent, évaporé à sec et repris dans 0,5 ml de Pyridine distillée.

d) Préparation des dérivés

a) Dérivés Méthyloximes (MO)

A l'extrait précédent est ajouté 0,5 ml d'une solution de Pyridine à 30 mg/ml de Méthoxyamine HCl (Eastman Kodak), préparée extemporanément. Cette solution est laissée en contact pendant la nuit à la température du laboratoire et à l'obscurité.

On peut également procéder à la réaction en faisant chauffer le mélange à 60°C pendant 5 heures.

b) Dérivés MO-TMS

La solution de Pyridine est évaporée à sec sous courant d'azote. Les stéroïdes sous forme de dérivés méthyloximes sont extraits par 2 fois 3 ml d'acétate d'éthyle, lavés par 1 ml d'une solution à 8 % de NaHCO_3 .

Après centrifugation, la phase organique est transvasée dans un tube cône dans lequel on rajoute 50 µg de Butyrate de Cholestéryle, servant de standard interne, puis évaporée à sec sous courant d'azote.

L'extrait sec est repris par exactement 1 ml de Pyridine ; après avoir agité pour dissoudre l'extrait sec, on prélève 0,1 ml (très précisément) de cette solution qui servira au comptage de la radio-activité. Le restant est à nouveau évaporé à sec, puis repris par 0,2 ml de BSTFA.

La réaction se fait pendant la nuit à la température du laboratoire, ou pendant 2 heures à 60°C.

L'échantillon urinaire ainsi préparé est prêt pour l'analyse chromatographique.

Le schéma général de la méthode peut être résumé par le tableau III.

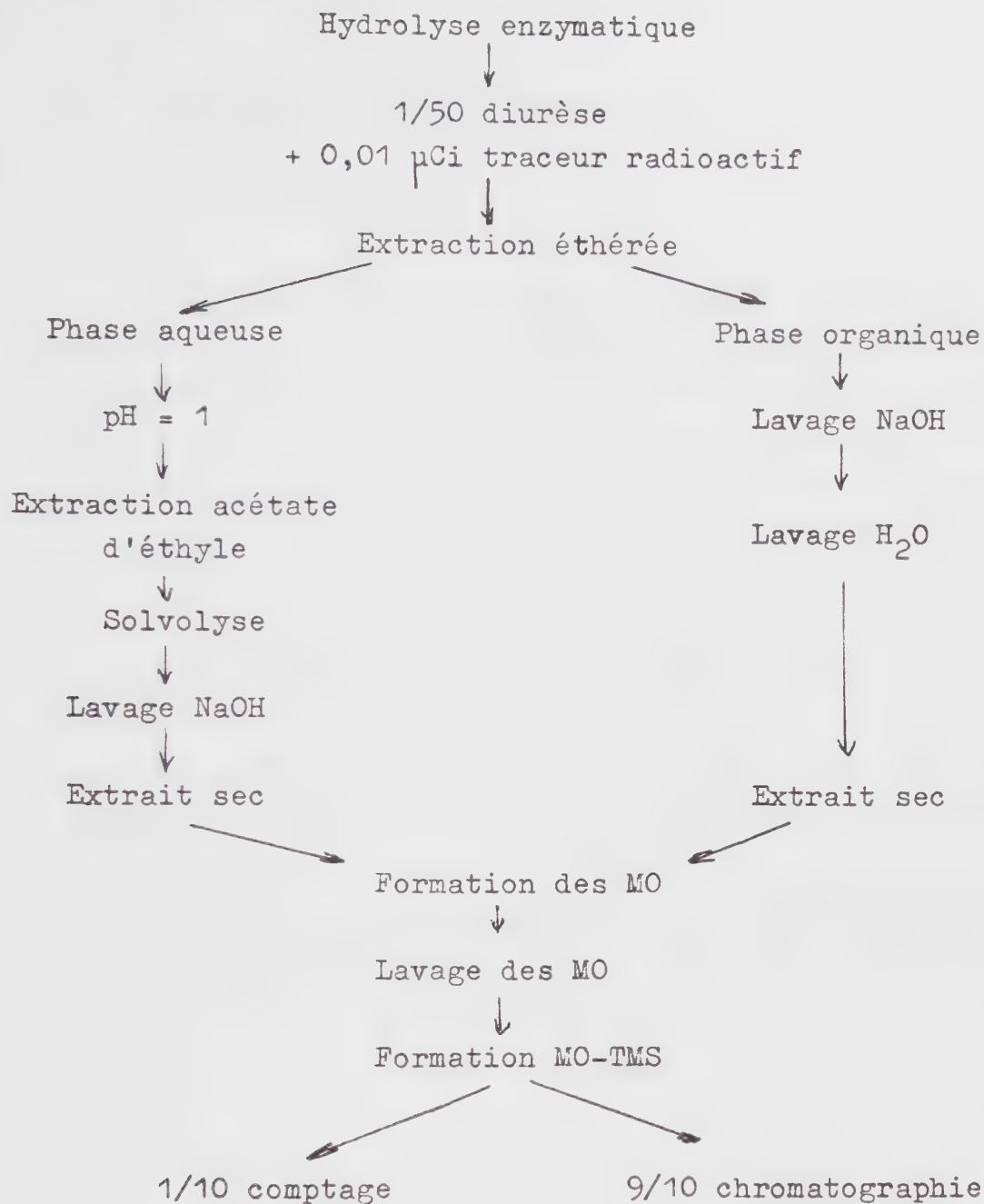


TABLEAU III

5 - EXPLOITATION DES CHROMATOGRAMMES

a) Aspect qualitatif

Chaque stéroïde sous forme de dérivé MO-TMS a été identifié par ses unités de méthylène, déterminées sur 2 colonnes, OV-1 et OV-17, en programmation linéaire de température. Parallèlement à la détermination des paramètres de rétention, la spectrométrie de masse a été réalisée ; l'analyse des spectres obtenus sera faite au chapitre "Résultats".

A ces effets, un mélange de stéroïdes purs a été traité jusqu'à l'obtention de dérivés MO-TMS.

Les valeurs des unités de Méthylène de chaque stéroïde considéré sont consignées dans le tableau IV.

La figure 8 montre un exemple de chromatographie sur une colonne imprégnée d'OV-1, d'un mélange de stéroïdes étalons sous forme de dérivés MO-TMS.

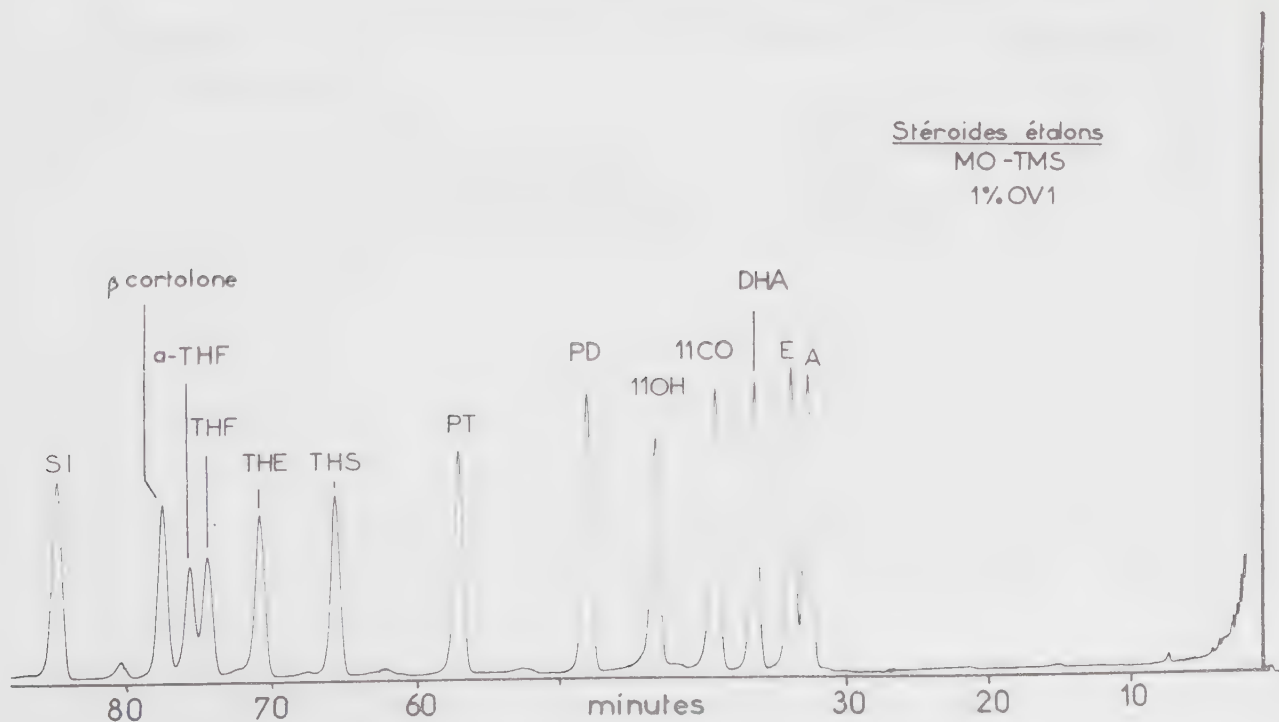


Figure 8.

	OV-1	OV-17	DEXIL
Androstérone	2501	2715	2562
Etiocholanolone	2522	2732	2600
D.H.A.	2563	2817	2624
11-Céto Etiocholanolone	2610	2885	2738
11-OH Androstérone	2667	2973	2755
Prégnanediol	2758*	2832*	2807*
Prégnanetriol	2905*	3014*	2961*
T.H.S.	3046	3227	3085
T.H.E.	3121	3377	3207
T.H.F.	3182	3454	3257
allo-T.H.F.	3196	3478	3267
Cortolone	3207*	3325*	3265*
β Cortolone	3235*	3379*	3306*
* : Dérivés TMS seuls			

TABLEAU IV

Unités de méthylène des principaux métabolites des stéroïdes neutres urinaires, déterminées en programmation de température.

- température initiale 180°C
- température finale 270°C
- taux de programmation 1,1°C/mn

La figure 9 montre un exemple de chromatographie d'un extrait urinaire neutre sous forme de dérivé MO-TMS, obtenu sur la même colonne.

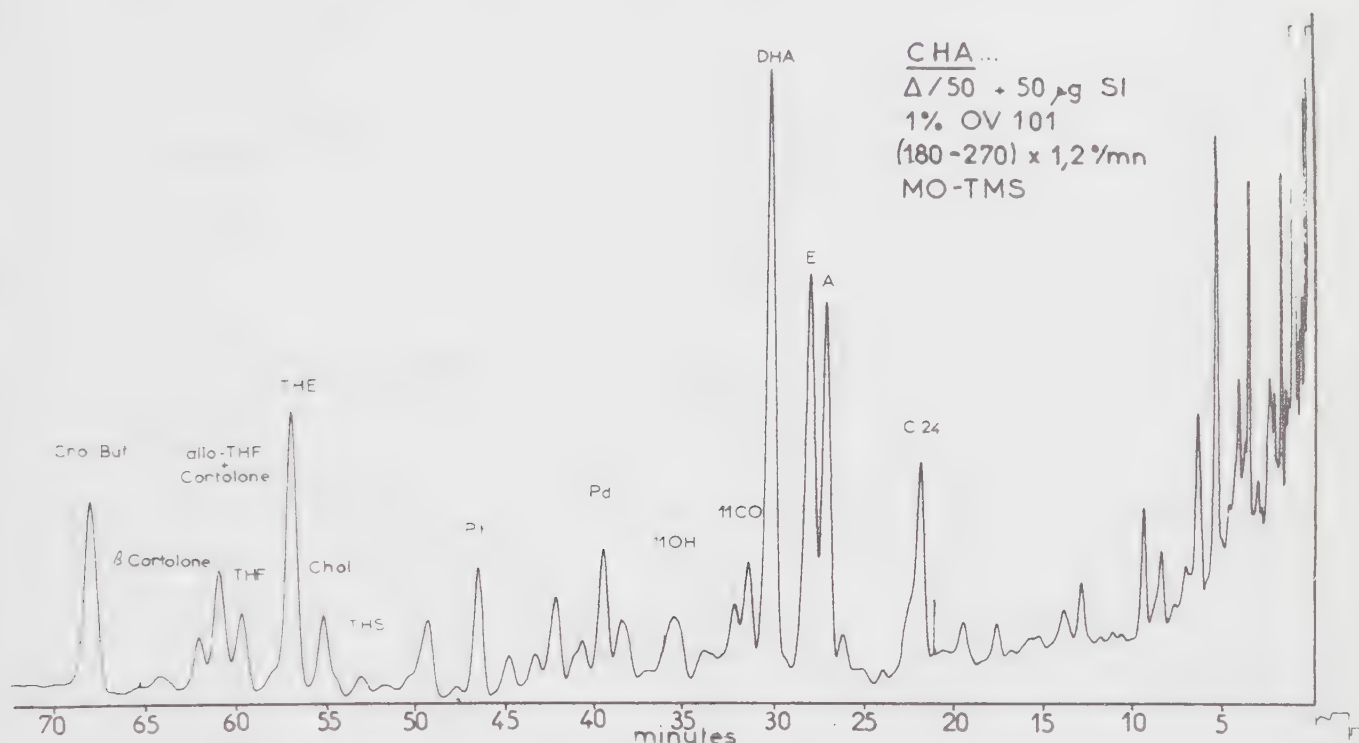


Figure 9.

b) Aspects quantitatifs

L'exploitation quantitative d'un chromatogramme pose des problèmes aussi complexes que l'exploitation qualitative. La première condition qui doit être réalisée est la linéarité de la réponse du détecteur, vis-à-vis de la quantité de substance l'ayant traversé. La facilité de la détermination quantitative sera d'autant plus grande que la gamme dynamique sera plus étendue. De plus, cette condition étant remplie, il est nécessaire de pouvoir déterminer la surface du pic d'un composé, et de la relier à la quantité de substance correspondante. Cela nécessite à la fois l'évaluation de la surface du pic et la connaissance exacte du volume injecté dans la colonne du chromatographe.

Il existe plusieurs moyens de déterminer la surface d'un pic, soit à l'aide d'un intégrateur électronique, soit à l'aide d'un planimètre, soit encore par pesée ; cette dernière méthode détruisant le chromatogramme, et enfin, les méthodes géométriques. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée.

La surface d'un pic est donnée par le produit de sa hauteur, par sa largeur, mesurée à mi-hauteur.

$$S = h \times l_{h/2}$$

Cette méthode a l'avantage d'être rapide et aussi précise que l'intégration mécanique.

La détermination de la relation quantité-surface, se heurte à la connaissance exacte du volume injecté, condition difficilement réalisable en pratique. Pour palier cet inconvénient, on introduit dans le mélange à analyser, une quantité connue d'une substance de structure voisine des composés à analyser et n'interférant évidemment pas avec les pics du chromatogramme. C'est le standard interne. Les surfaces des composés sont alors évaluées par rapport à la surface du standard interne. L'étape suivante est la connaissance du "coefficient de réponse" de chaque composé vis-à-vis du standard interne, c'est-à-dire le rapport de la surface de chaque composé à la surface du standard interne pour une quantité de substance connue.

Cette méthode d'étalonnage interne ne nécessite donc que la connaissance exacte de la concentration de chaque composé, ce qui est très facilement réalisable. C'est cette méthode que nous avons utilisée, le standard interne choisi étant le Butyrate de Cholestéryle.

- Préparation des stéroïdes étalons et détermination du coefficient de réponse

Chaque stéroïde est conservé dans la Pyridine à une concentration de 1 mg/ml. Nous préparons la solution d'étalons

en faisant un mélange de quantité égale de tous les stéroïdes et du standard interne. Ce mélange est traité parallèlement aux extraits urinaires, exception faite de l'hydrolyse et de l'extraction. Après chromatographie exécutée dans les mêmes conditions que les extraits urinaires, nous déterminons le coefficient de réponse de chacun des stéroïdes vis-à-vis du Butyrate de Cholestéryle. Ce coefficient est donné par :

$$R_{ST} = \frac{\text{Aire du pic de Butyrate de Cholestéryle}}{\text{Aire du pic du stéroïde étalon considéré}}$$

Les qualités d'une colonne donnée n'étant pas constantes dans le temps, la valeur du coefficient de réponse n'est considérée comme valable que pendant un laps de temps relativement court. Pratiquement, chaque série d'injection est accompagnée de la détermination du coefficient de réponse, considéré valable pour la journée.

- Expression finale des résultats

L'excrétion urinaire est exprimée très généralement par rapport à une période de 24 heures. L'évaluation quantitative de chacun des pics des stéroïdes considérés dans le chromatogramme est obtenue par la formule :

$$\mu\text{g}/24 \text{ h} = R_U \times R_{ST} \times Q \times R \times 50$$

dans laquelle :

R_{ST} : est le coefficient de réponse du stéroïde considéré.

R_U : le rapport de l'aire du stéroïde à l'aire du standard interne, dans l'extrait urinaire.

Q : la quantité de standard interne rajoutée à l'échantillon.

R : l'inverse du rendement de la méthode, obtenu en faisant le rapport du nombre de dpm ajouté à l'échantillon avant traitement, à celui après traitement de l'extrait urinaire.

c) "Blanc" de la méthode
.....

Les solvants organiques utilisés ainsi que la préparation enzymatique nécessaire à la libération des stéroïdes neutres de leur conjugaison, peuvent induire dans le chromatogramme des pics parasites. Nous avons testé ces facteurs en traitant une solution d'*Helix Pomatia* (1 ml d'enzyme dans 50 ml d'eau distillée), selon la méthode décrite précédemment.

La figure 10 montre la chromatographie d'une telle préparation. La quantité de standard interne rajoutée était de 50 ug. On note la présence d'un pic important ayant une valeur d'unité de méthylène égale à celle du cholestérol. Ce pic qui est effectivement du cholestérol provient de la préparation enzymatique. Celle-ci étant préparée à partir du suc digestif d'*Helix Pomatia*, grossièrement purifié.

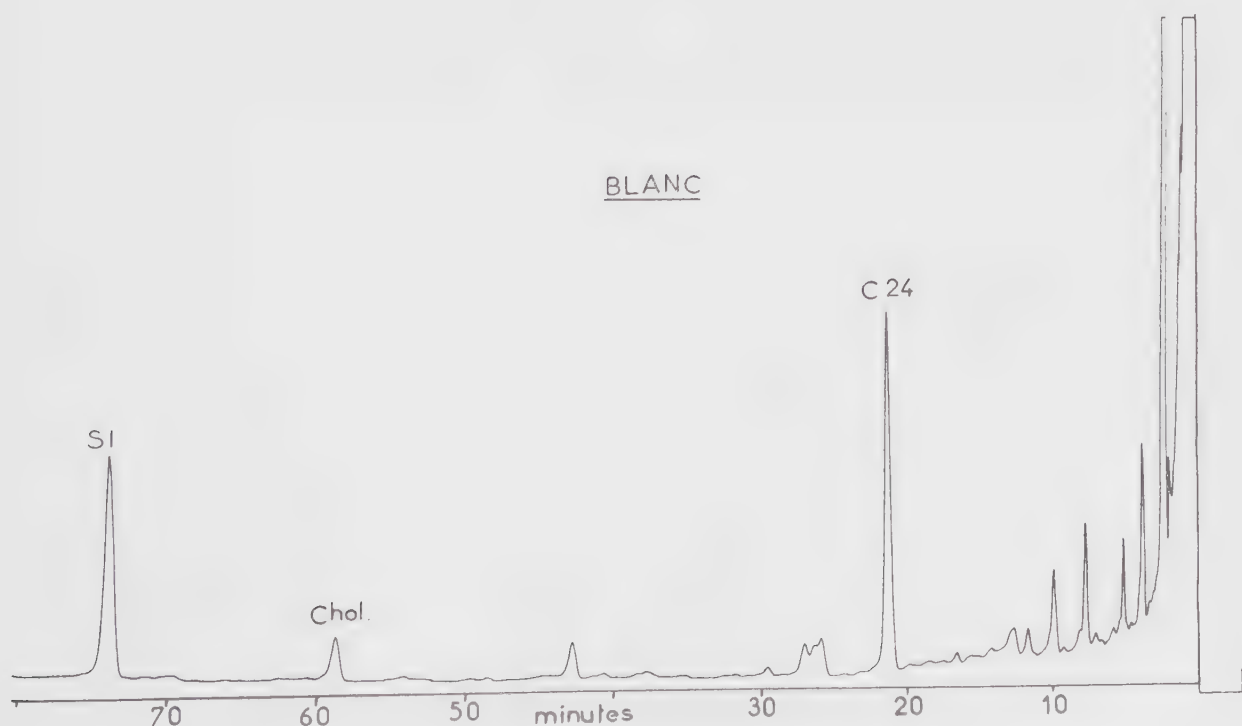


Figure 10.

CHAPITRE III.

RESULTATS

1. RESULTATS CHEZ LES HOMMES NORMAUX

Le "profil" des métabolites neutres des stéroïdes urinaires a été réalisé sur des volontaires mâles âgés de 25 à 35 ans. La figure 11 montre un exemple de séparation chromatographique de l'extrait urinaire d'un adulte mâle, réalisée sur une colonne OV-17.

Nous nous sommes limités dans l'évaluation quantitative, à des pics particulièrement bien individualisés, ne présentant pas d'ambiguïté quant à leur pureté et représentatifs des étapes essentielles du métabolisme stéroïdien.

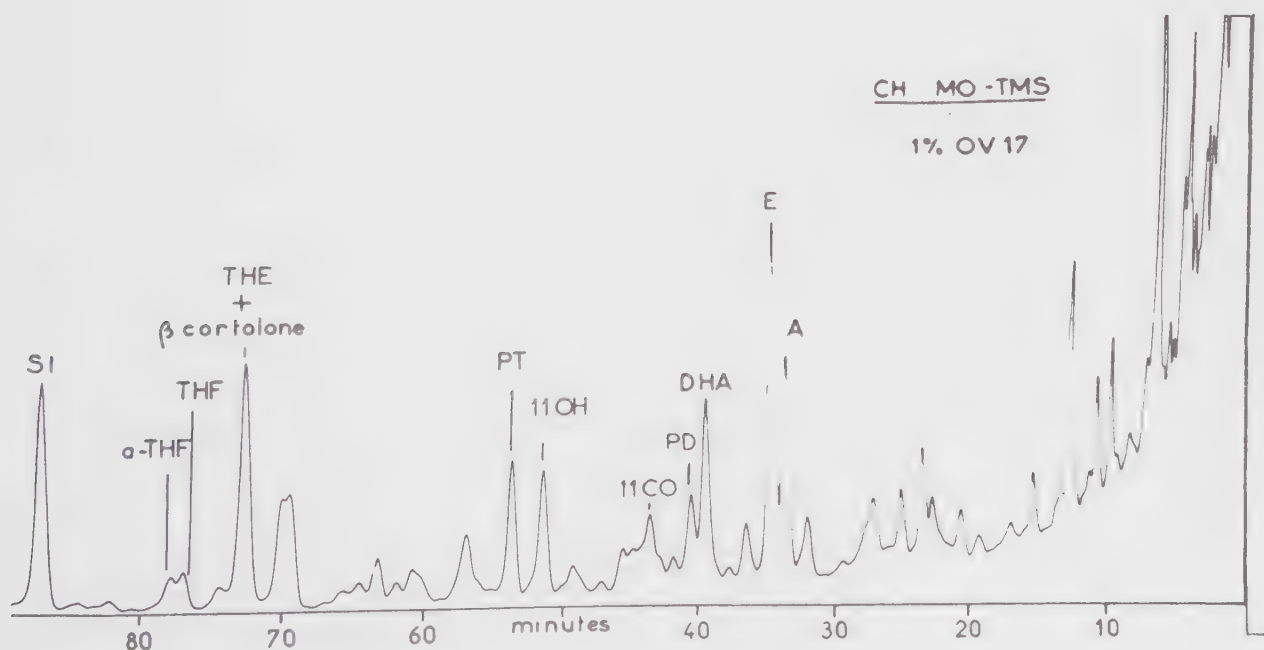


Figure 11

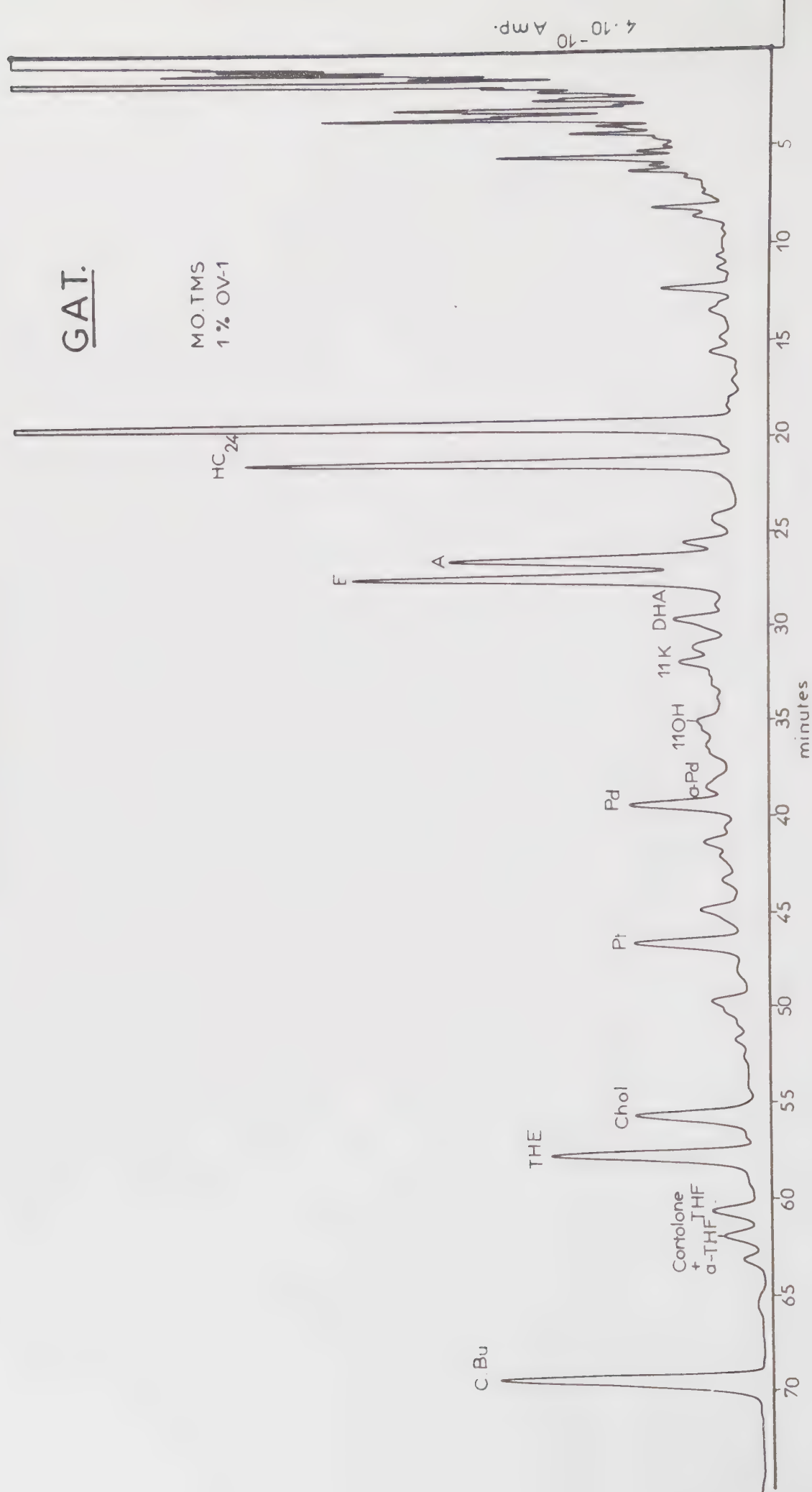


Figure I2

Profil des métabolites urinaires, chez une femme normale, au 4ème jour du cycle.
Conditions opératoires voir texte.

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant (tableau V).

	MOYENNE mg/24 h	ECART-TYPE	VALEURS EXTREMES mg/24 h
Androstérone	3,35	0,65	2,28 - 3,97
Etiocholanolone	3,20	0,57	2,39 - 3,88
D.H.A.	1,20	0,77	0,41 - 2,14
11-Céto Etio.	0,51	0,11	0,35 - 0,66
11-OH Andro.	0,70	0,21	0,38 - 0,94
Prégnanediol	0,85	0,24	0,46 - 1,10
Prégnanetriol	1,34	0,13	1,20 - 1,51
T.H.E.	4,17	1,45	2,20 - 6,30
T.H.F.	2,56	1,26	0,50 - 3,8
Allo-T.H.F.	2,95	0,64	2,12 - 3,9
β Cortolone	0,65	0,2	

Tableau V

2. RESULTATS OBTENUS CHEZ LES FEMMES NORMALES

Nous avons également étudié l'excrétion urinaire des métabolites neutres des stéroïdes hormonaux chez des femmes volontaires, normalement réglées. Les "profils" ont été réalisés à diverses périodes du cycle menstruel, comptées à partir de l'ovulation.

Les figures 12, 13, 14 montrent 3 exemples de "profils" à diverses périodes du cycle. De même que précédemment, nous nous sommes limités à l'évaluation de pics caractéristiques du métabolisme.

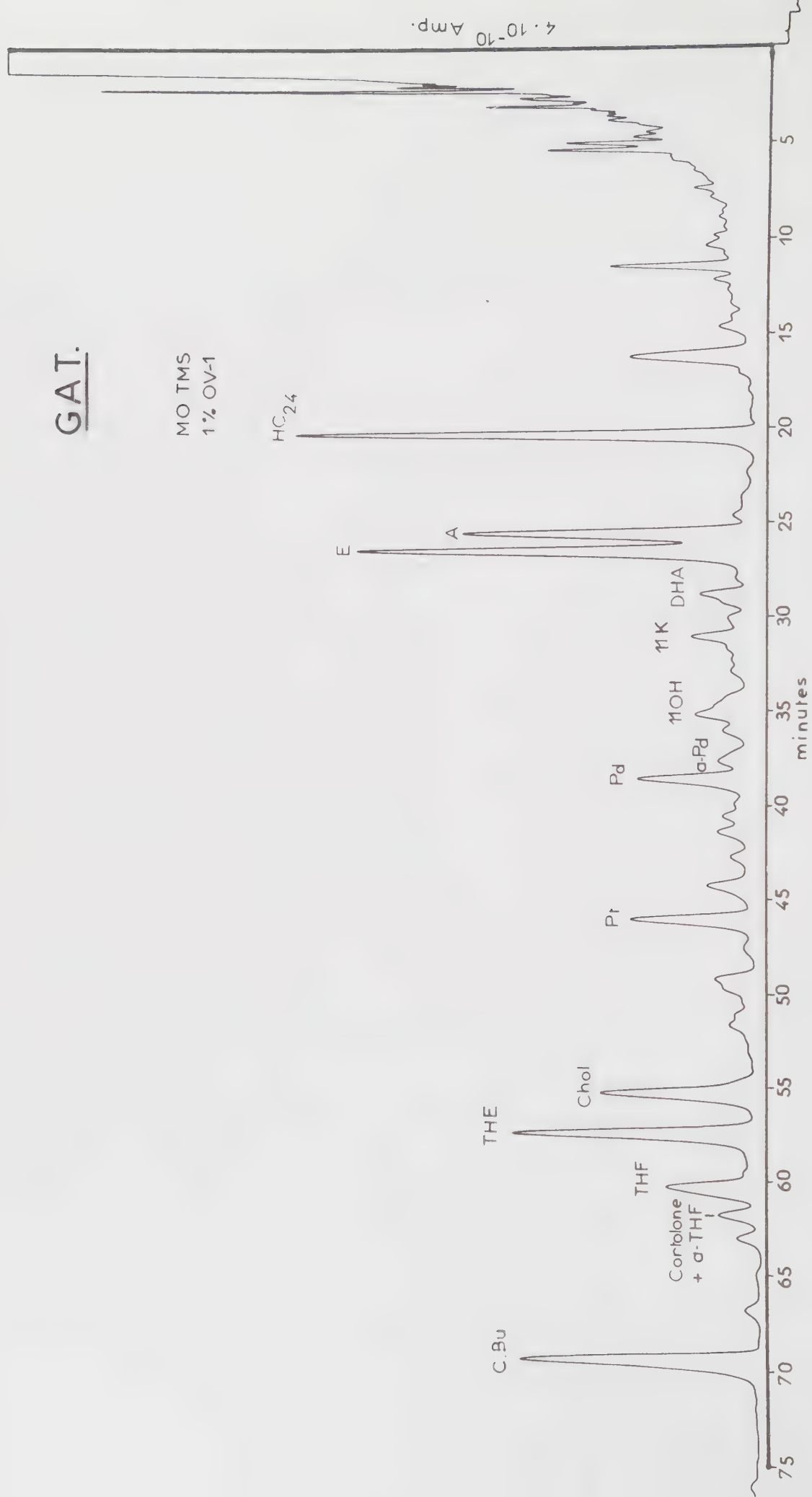


Figure I3

Profil des métabolites neutres urinaires chez une femme normale au 14^{ème} jour du cycle.
Conditions opératoires voir texte.

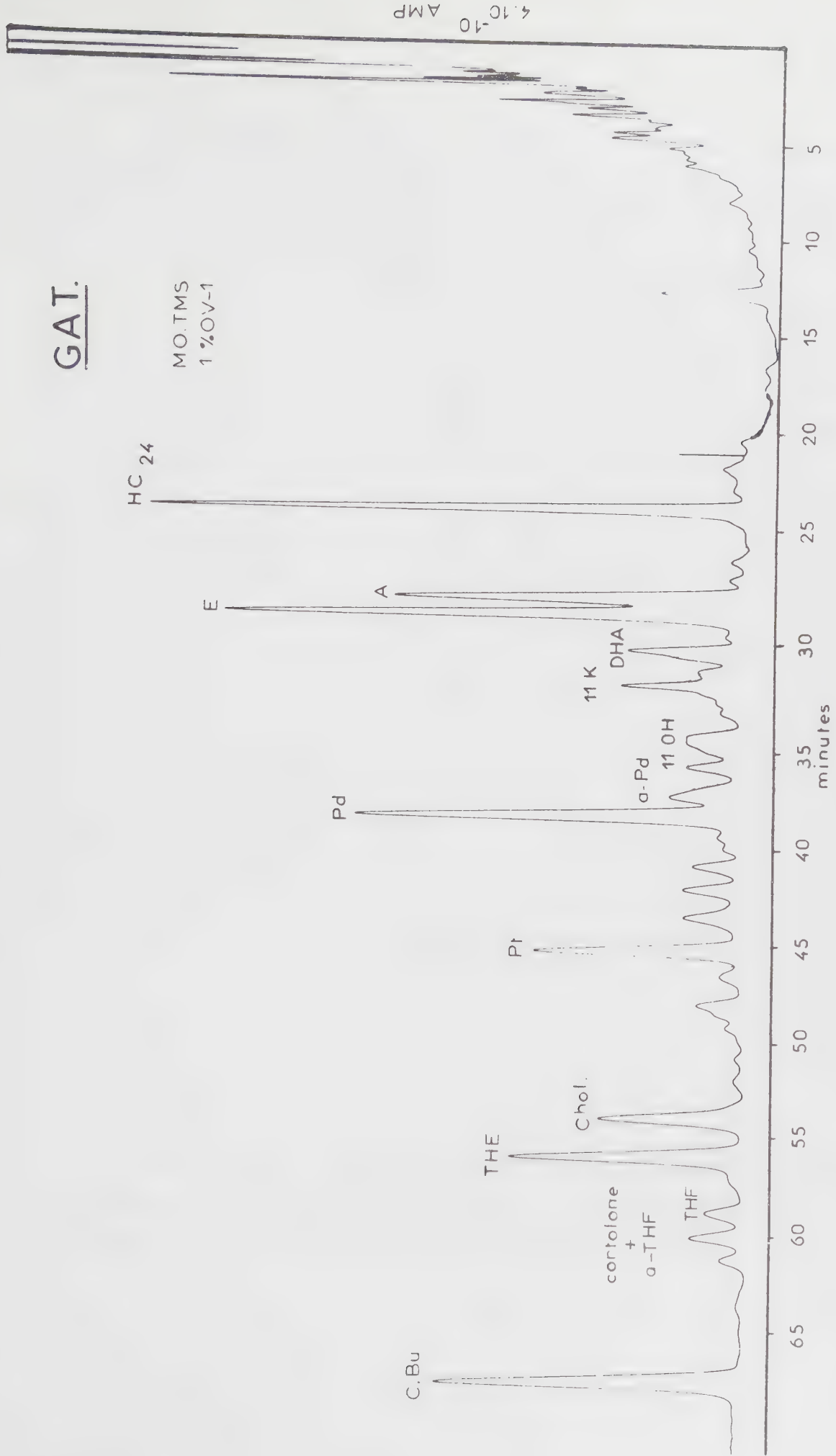


Figure I4

Profil des métabolites neutres urinaux chez une femme normale au 21^{ème} jour du cycle.
Conditions opératoires voir texte.

Les valeurs normales, exception faite pour celles du Prégnanediol et du Prégnanetriol, dont les taux sont cycliques, sont résumées dans le tableau suivant (tableau VI).

	n (1)	m (2)	s (3)	Valeurs extrêmes mg/24 h
Androstérone	47	2,04	0,87	0,95 - 4,48
Etiocholanolone	48	2,32	0,90	0,96 - 5
D.H.A.	40	0,34	0,20	0,10 - 1,16
11-Céto Etiocholanolone	28	0,55	0,17	0,24 - 0,80
11-OH Androstérone	27	0,56	0,22	0,16 - 0,95
T.H.E.	45	3,58	1,4	1,3 - 7
T.H.F.	42	1,16	0,7	0,2 - 2,1
Allo-T.H.F.	42	1,6	0,22	1,3 - 2
β Cortolone	40	0,5	0,2	
(1) : nombre de cas (2) : moyenne mg/24 h (3) : écart-type				

Tableau VI

Les taux de l'excrétion urinaire du Prégnanediol et du Prégnanetriol, évalués au cours du cycle, avant et après l'ovulation, sont résumés dans le tableau VII.

	PREGNANEDIOL		PREGNANETRIOL	
	Moyenne mg/24 h	valeurs extrêmes	Moyenne mg/24 h	valeurs extrêmes
<u>Jours avant ovulation :</u>				
- 11	1,14	0,67-1,61	1,37	0,86-1,90
- 8	0,93	0,58-1,10	0,97	0,6 -1,35
- 5	0,95	0,46-1,34	0,92	0,74-1,33
- 3	1,21	0,52-1,86	1,18	0,85-1,31
<u>Ovulation :</u>	1,22	0,96-1,40	1,30	0,95-1,46
<u>Jours après ovulation :</u>				
+ 3	1,50	0,7 -2,85	0,95	0,63-1,38
+ 5	2,20	0,3 -5,3	1,51	1,18-1,69
+ 7	2,93	0,65-5,75	1,60	0,90-2,36
+ 11	3,13	1,67-4,72	1,29	1,15-1,57
+ 13	2,96	0,92-4,65	1,39	0,79-2,1
+ 15	1,56	0,70-2,42	1,06	0,6 -1,5

Tableau VII

valeurs du Prénanediol et
du Prénanetriol au cours
du cycle menstruel.

La variation du Prégnanediol et du Prégnanetriol au cours du cycle menstruel, est illustrée par les courbes de la figure 15.

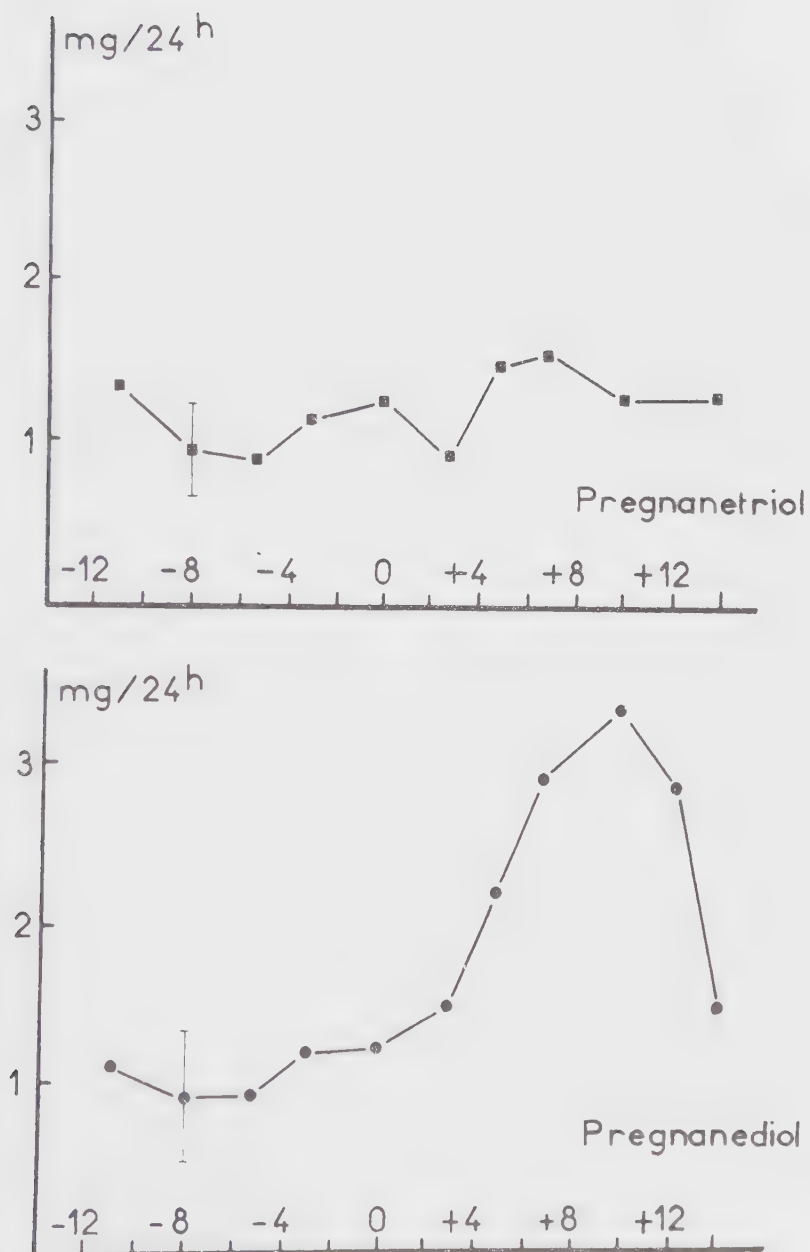
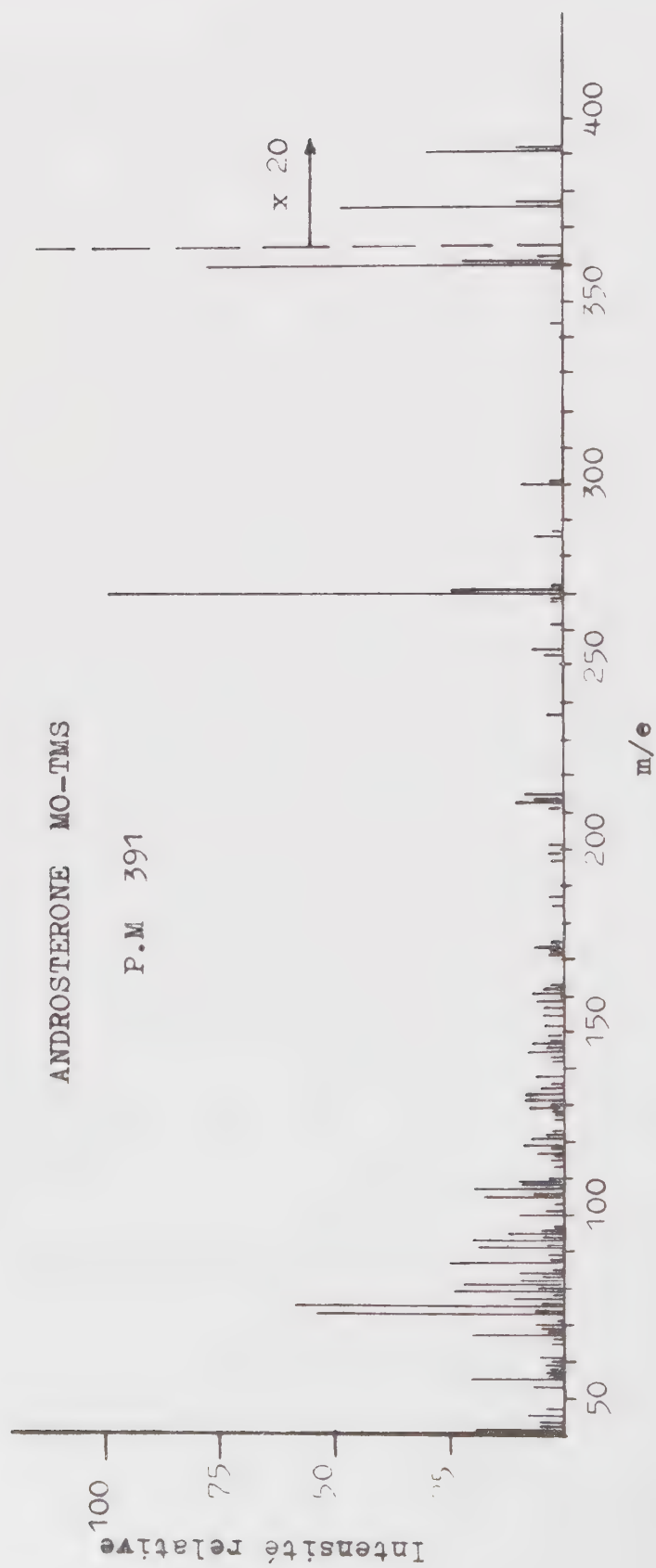


Figure 15.



3. SPECTRES DE MASSES

Tous les composés mesurés ont été authentifiés par leur spectre de masse, après élimination du bruit de fond. Celui-ci est dû, indépendamment de celui inhérent à tout appareil, à la perte de la phase liquide, garnissant la colonne du chromatographe. Ce type de bruit de fond, spécifique de la combinaison chromatographie-spectrométrie de masse, donne des pics importants qui doivent être soustraits des pics des spectres de masses des composés étudiés. Pratiquement, ce bruit de fond n'est autre que le spectre de masse de la phase liquide. Dans le cas des phases liquides à base de polymère de silicone, ces pics sont aisément reconnaissables, et peuvent, en pratique courante, servir de repère de masse dans les spectres.

Pratiquement, ces types de bruits de fond, donnent des pics, dont les plus importants sont les suivants :

$m/e = 73, 133, 147, 207, 267, 281, 341, 355, 429, 503.$

* Androstérone (MO-TMS)

L'ion moléculaire indique une masse de 391 pour l'androstérone MO-TMS.

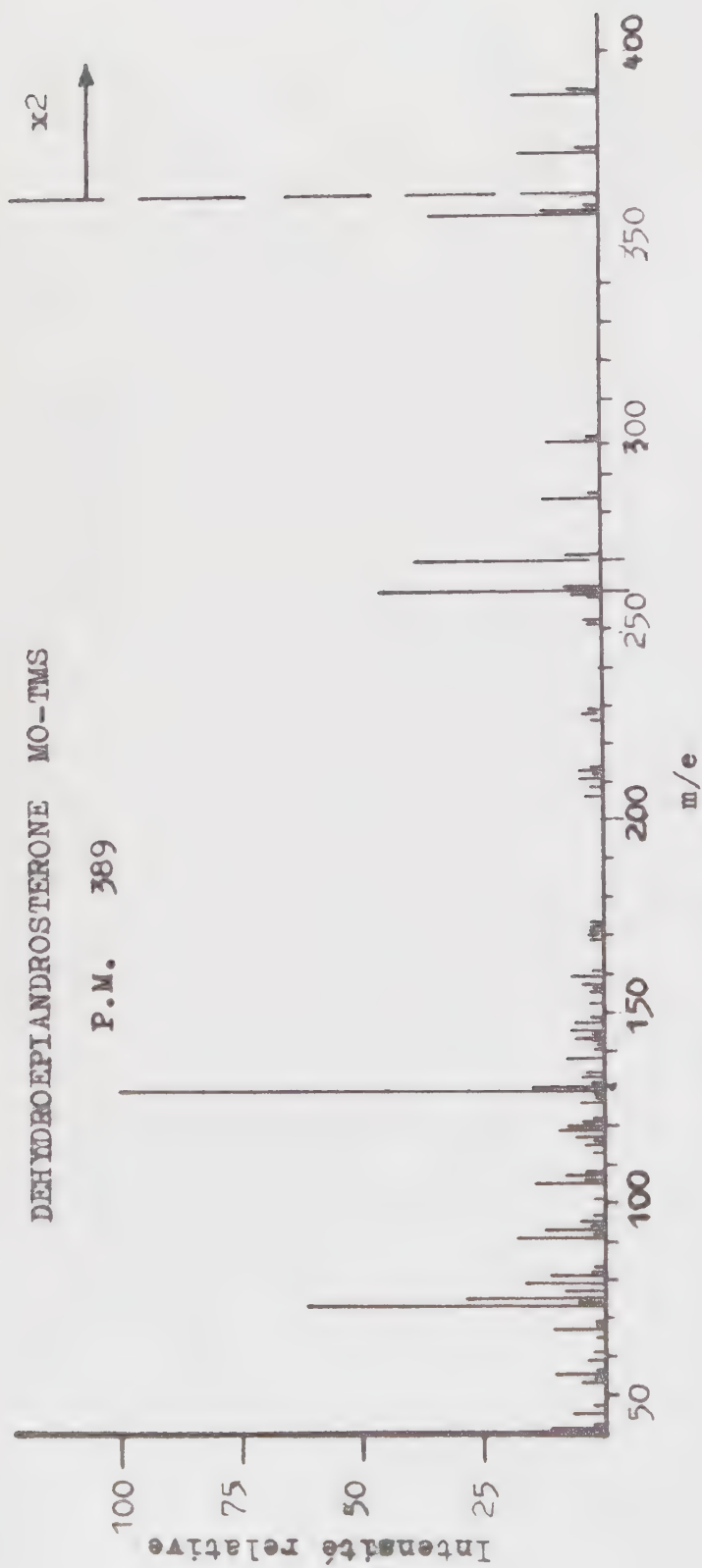
On trouve un pic important à $m/e = 376$, correspondant à la perte d'un groupement méthyle, puis un pic à $m/e = 360$, correspondant à la perte d'un groupement $O-CH_3 = 31$.

La perte d'un fragment à $m/e = 270$, correspond à la fragmentation M-90-31.

La masse 90 étant caractéristique du groupement $HO-(CH_2)_7Si$.

DEHYDROEPIANDROSTERONE MO-TMS

P.M. 389



PREGNANEDIOL DI-TMS

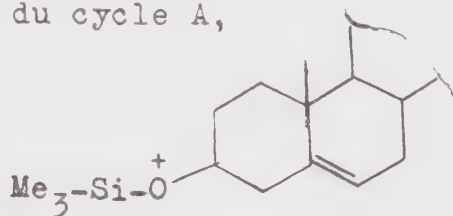
P.M. 464



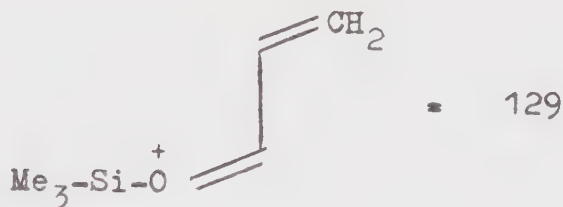
* D.H.A. (MO-TMS)

L'ion moléculaire indique une masse de 389 pour la D.H.A. MO-TMS.

On trouve un fragment à $m/e = 129$, caractéristique des structures $\Delta^5 \beta$ ol TMS (14). Il provient de la fragmentation du cycle A,



et d'un réarrangement,



On retrouve également la fragmentation (M^+-15) = 374, perte d'un groupement méthyle, puis (M^+-31) = 358 par perte de O-CH_3 et ($M-90$) = 299 perte du fragment $\text{O-(CH}_3)_3\text{Si}$, ainsi que ($M-90-31$) = 268 et ($M-129$) = 260.

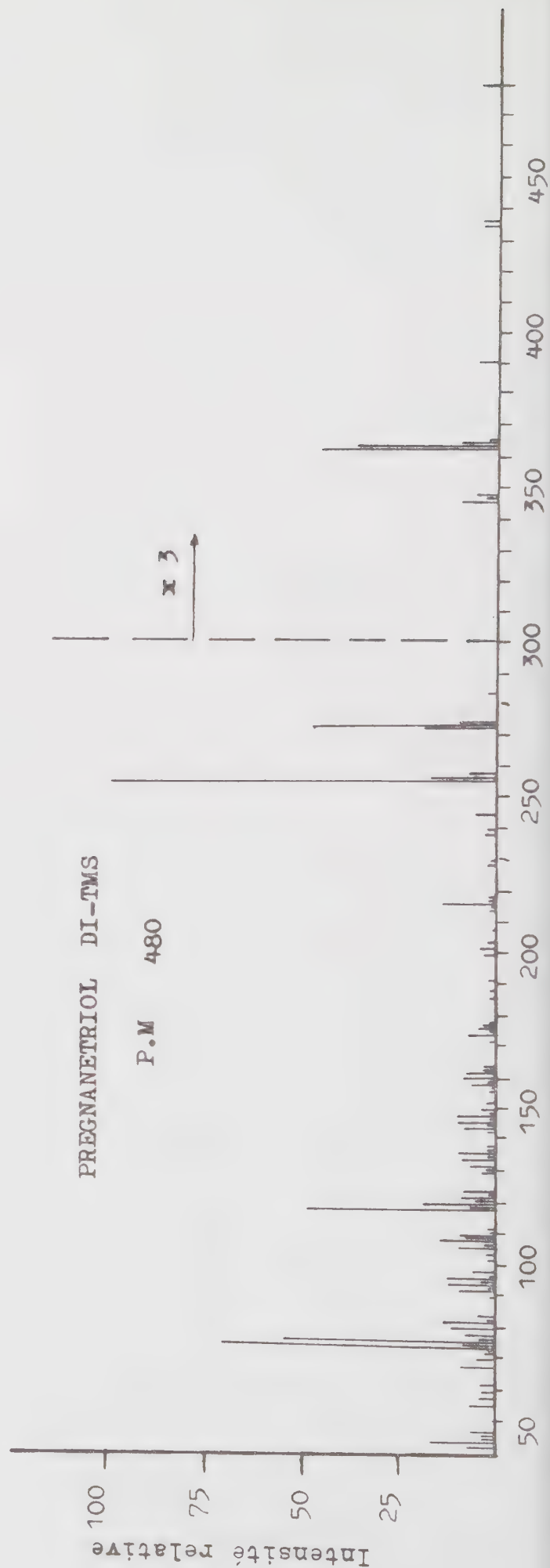
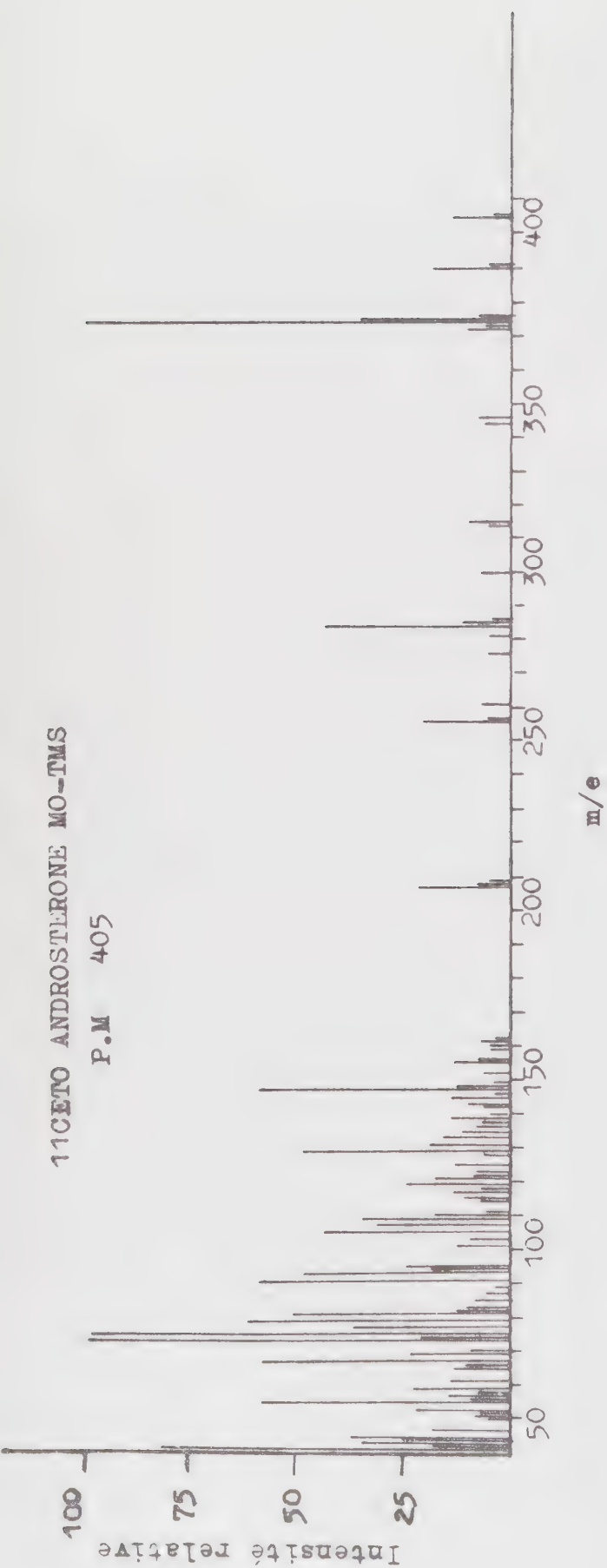
Ce spectre montre donc la présence d'un groupement N-OCH_3 et $\text{O-(CH}_3)_3\text{Si}$.

* Prégnanediol

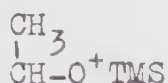
Le spectre de masse du Prégnanediol di-TMS est particulièrement caractéristique. L'ion moléculaire indique une masse de 464.

On retrouve les pics à ($M-15$), ($M-90$) et ($M-90-90$) caractéristiques de la perte d'un groupement méthyle, d'un groupement OTMS, puis de 2 groupements OTMS et un pic à $m/e = 269$, perte de 2 groupes silyle et d'un méthyle.

Le pic de base à $m/e = 117$ donne une allure caractéristique au spectre. On le retrouve dans tous les composés



possédant la chaîne latérale de prégnanediol. Il est dû à un clivage α , 17, 20 de la chaîne latérale conduisant à l'ion



On note également un pic à $m/e = 347$ correspondant à (M-117), perte de la chaîne latérale.

* Prégnanetriol TMS

L'ion moléculaire de faible intensité montre un poids moléculaire de 480. On trouve également le pic à $m/e = 363$ (M-117) dû à la perte de la chaîne latérale par le même mécanisme que pour le prégnanediol. Le pic à $m/e = 348$ correspond à (M-117-15), perte de la chaîne latérale et d'un groupement CH_3 et celui à $m/e = 345$ correspond à la perte de la chaîne latérale et d'une molécule d'eau, signant la présence d'un groupement OH libre.

On trouve des pics importants à $m/e = 273$ correspondant à (M-117-90), perte de la chaîne latérale et d'un groupement silyle, à $m/e = 255$ correspondant à (M-117-90-18) perte de la chaîne latérale, d'un groupement silyle et d'une molécule d'eau.

Dans la zone des faibles masses, on trouve les fragments à $m/e = 117, 145, 159, 173$, correspondant à la perte de la chaîne latérale, et aux divers fragments du cycle D.

* 11-Céto Etiocholanolone MO-TMS

L'ion moléculaire indique une masse de 405. On retrouve ici, la fragmentation caractéristique des stéroïdes MO-TMS. Ainsi, on retrouve les pics à $m/e = 390$ (M-15) et 374 correspondant à (M-31). Puis les pics à $m/e = 315, 300$, et 284, correspondant respectivement à (M-90), (M-90-15) et (M-90-31).

Dans tous ces spectres, on trouve les pics à $m/e = 73$ et 75 , correspondant à la fragmentation d'un groupement $(CH_3)_3Si OH$ en donnant



Le fragment à $m/e = 73$ est présent également dans le bruit de fond.

CHAPITRE IV.

DISCUSSION

I - ASPECTS METHODOLOGIQUES

1) Choix de la phase stationnaire

Il existe plusieurs centaines de phases stationnaires pour la chromatographie en phase gazeuse. Les caractéristiques recherchées ici seront : une bonne séparation entre les métabolites à mesurer, et une grande thermostabilité, nécessitées par l'utilisation de la programmation de température et de la combinaison chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse. De ce fait, un petit nombre seulement sont utilisables : ce sont principalement celles à base de polymères de silicones.

Schématiquement, on peut distinguer 2 types de phases :

- celles dites "non sélectives", telles OV-1 ou SE 30, qui sont des polymères de diméthysiloxane. Elles sont caractérisées par leur stabilité chimique et thermique, et une faible tension de vapeur aux températures maximum d'utilisation (environ 300°C). L'élution des stéroïdes, dans les colonnes garnies avec ce type de phase, est principalement réalisée en fonction de leur point d'ébullition, et de la forme de la molécule.

- Les phases dites "sélectives", telles OV-17 ou QF 1, obtenues par adjonction de groupements phényl ou fluoro-alkyl au polymère de diméthylsiloxane. La séparation des stéroïdes sur ce type de phase procède du même principe que celui des phases non sélectives, auquel s'ajoutent les interactions entre l'échantillon à chromatographier avec

la phase stationnaire. Celle-ci peut avoir des affinités particulières pour des types de structure ou groupements fonctionnels donnés. Ainsi, la phase QF 1, est une phase "sélective" pour les groupements carboxyles, mais n'a que peu d'affinité pour les groupements hydroxyles. De ce fait, ce type de phase permettra une séparation de ces 2 types de groupements fonctionnels.

Le choix de la phase stationnaire est en fait conditionné par le type de séparation désiré, et également par le problème posé par la séparation. Ainsi, dans le cas de la détection d'un seul composé, le choix de la phase stationnaire sera dicté principalement par la considération de la "polarité" du composé à éluer.

Dans le cas de séparation simultanée d'un grand nombre de métabolites tel que le problème s'est posé pour nous, il s'agit d'éluer des composés de polarités relativement différentes. Cette séparation simultanée ne peut être parfaitement réalisée sur un seul type de phase stationnaire ; de plus, l'utilisation d'un seul type de phase ne permet pas une spécificité suffisante. L'utilisation d'une phase non sélective telle que l'OV-1 seule ne permet pas une bonne séparation de l'allo-THF et de la cortolone sous forme de dérivé MO-di TMS. Mais une phase plus sélective, telle l'OV-17, ne permet pas la séparation du THE et de la β cortolone également sous forme di-TMS. Ces aspects qualitatifs et quantitatifs nous ont amené à utiliser simultanément ces deux types de phases.

La chromatographie d'un même mélange de stéroïde, effectuée simultanément sur 2 phases stationnaires de caractéristiques différentes, permet l'obtention de deux types de chromatogrammes donnant ainsi une grande spécificité à la séparation.

Récemment, un nouveau type de phase stationnaire a été commercialisé (DEXIL GC 300), dont la principale caractéristique extrêmement intéressante outre sa grande stabi-

STANDARDS TMS

12ft 1% DEXIL

(180-270) x 1,5 %mn

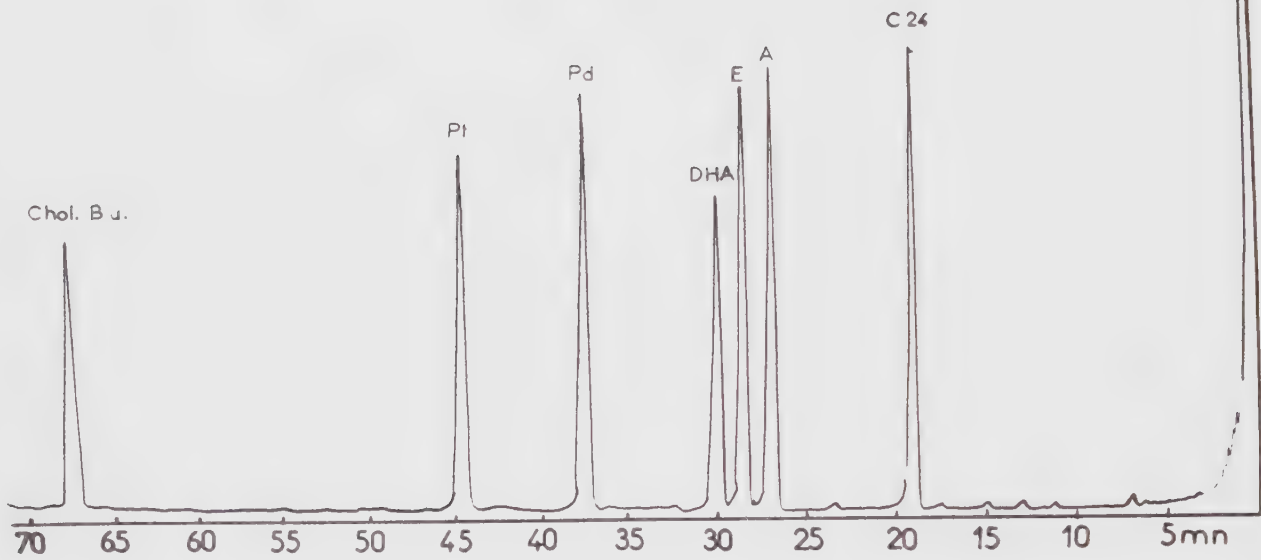


Figure I6

STANDARDS MO-TMS

1% DEXIL

(180-270) x 1,1 %mn

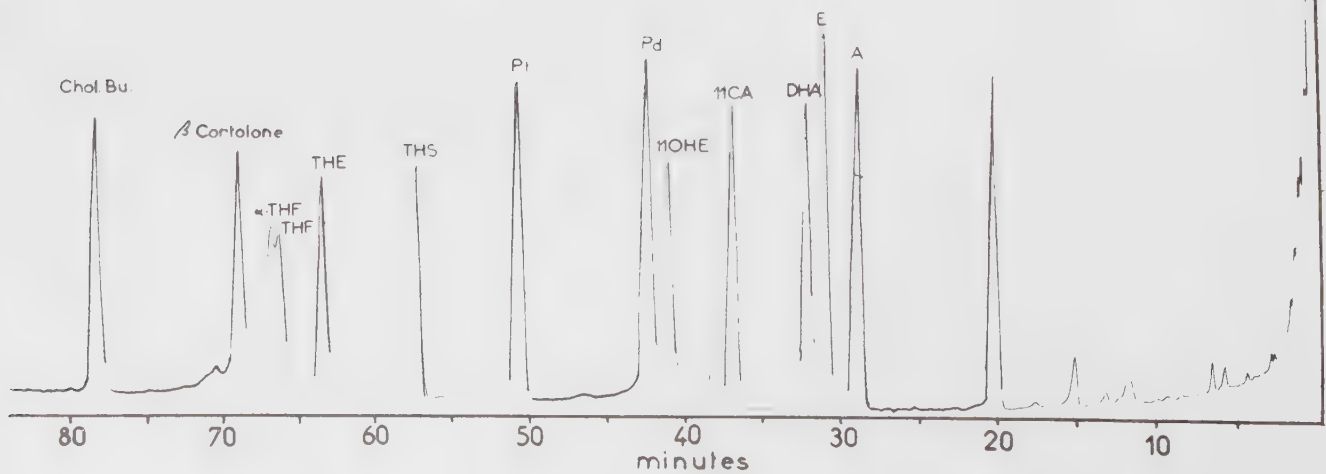


Figure I7

lité thermique, réside dans la séparation des métabolites 5α et 5β des androgènes, jamais parfaitement réalisée avec les phases OV-1 et OV-17, mais ne semble apporter aucune amélioration sensible dans la séparation des corticostéroïdes. Les figures 16 et 17, montrent les séparations obtenues avec ce type de phase de 2 types de dérivés TMS et MO-TMS.

2) Utilisation des dérivés

L'utilisation des dérivés s'est avérée d'un grand intérêt pour l'analyse des stéroïdes en phase gazeuse. Ils leur confèrent une plus grande volatilité et diminuent leur capacité d'adsorption due à la présence de groupements polaires. Dans certains cas, ils sont indispensables à l'analyse en stabilisant des structures dégradées à haute température.

Le choix de tel ou tel type de dérivé est conditionné par plusieurs facteurs : volatilité et stabilité du dérivé formé, conservation de la structure stéroïdienne, type et position des différents groupes fonctionnels, et également par la caractéristique de la molécule stéroïdienne (présence ou non de chaîne latérale), de plus le dérivé choisi ne doit donner qu'un seul composé. Ce choix est parfois conditionné par l'aspect quantitatif du problème posé, la présence d'un composé en très faible quantité nécessite un abaissement important du seuil de sensibilité de la détection, entraînant ainsi un type particulier de détecteur (détecteur à capture d'électron nécessitant des dérivés introduisant des groupements électrophiles.)

Pratiquement, le choix du dérivé est grandement conditionné par le type de la molécule stéroïdienne. Les dérivés choisis ne seront pas les mêmes, si l'on s'adresse à des stéroïdes tels les métabolites des corticostéroïdes (C 21) ou des prégnanes (C 21) ou aux métabolites des androgènes (stéroïdes en C 19). Ils ne seront pas non plus les mêmes selon que la chaîne latérale est de type glycol ou de type dihydroxyacétonique.

Dans le cas d'une méthode séparant simultanément tous ces types de stéroïdes, les choix seront en fait relativement limités et seront pratiquement conditionnés par leur possibilité d'application aux stéroïdes possédant une chaîne dihydroxyacétonique, ce type de molécule étant le plus difficile à stabiliser.

Plusieurs types de dérivés ont été proposés : KIRSHNER et FALES présentèrent en 1962 (60) une méthode de séparation de la cortisone sous forme de dérivé bis-méthylènedioxycortisone (BMD), stable en phase gazeuse. Mais, avec d'autres stéroïdes tels le THE, ce type de dérivé donnait en plus du composé majeur, un certain nombre d'autres pics, rendant cette méthode impropre à une utilisation plus générale.

En 1965, BROOKS (12) proposa l'utilisation de dérivés acétylés, pour la chromatographie en phase gazeuse des corticostéroïdes.

Mais si les stéroïdes 17 α 21 diacétoxy 20 cétones donnent un pic correspondant au dérivé désiré, ils donnent lieu également à la formation d'un second composé semblant être le 21 acétoxy Δ 16 20 cétone dont l'importance croît au fur et à mesure du vieillissement de la colonne.

Ces dérivés ont un temps de rétention relativement long lorsqu'ils sont chromatographiés sur des colonnes "polaires", et ne donnent pas des pics suffisamment bien définis pour une détermination quantitative.

Un autre type de dérivé utilisable pour la chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes à chaîne dihydroxyacétonique, fut également proposé par BROOKS et WATSON en 1968 (13) et ANTHONY et col. (1) en 1969 : les esters cycliques des acides alkylboroniques. Les auteurs ont montré que ces acides étaient susceptibles de former des boronates cycliques, avec des composés ayant 2 ou plusieurs groupes fonctionnels voisins. En particulier, ils formèrent des boronates stables avec les corticostéroïdes possédant des groupements hydroxyles en position 17 et 20, 20 et 21 et 17, 20 et 21.

Ils étudièrent le comportement chromatographique en particulier, des n-butylboronates, cyclohexylboronates et phénylboronates, et montrèrent la bonne stabilité de ces dérivés, ainsi que la capacité qu'ils ont de stabiliser ce type de chaîne latérale.

Nous avons proposé (22) un nouveau type de dérivés pour la stabilisation de la chaîne latérale d'un certain nombre de corticostéroïdes, en utilisant les propriétés d'énolisation des fonctions cétones, en présence d'agents nucléophiles (catalyse basique). La stabilisation de la chaîne latérale était ainsi réalisée sous forme d'énol triméthylsilyléther, possédant un excellent comportement en chromatographie en phase gazeuse.

Si ces divers dérivés, à l'exception des dérivés acétylés, donnaient de bons résultats, dans le cas des chaînes latérales polyhydroxylés, ils n'étaient pas entièrement satisfaisants avec les autres types de stéroïdes présents dans l'urine. De plus, la conversion des corticostéroïdes, sous forme de leurs dérivés, n'était pas absolument quantitative.

Une solution globale à ce problème fut apportée en 1966 par GARDINER et HORNING (41) utilisant successivement les dérivés méthyloximes se fixant sur les groupements cétoniques, puis les dérivés triméthylsilyléthers sur les groupements hydroxyles. Ce type de dérivé mixte, non spécifique d'un ensemble de groupes fonctionnels donnés, permet la chromatographie en phase gazeuse, de l'ensemble des métabolites neutres des stéroïdes urinaires.

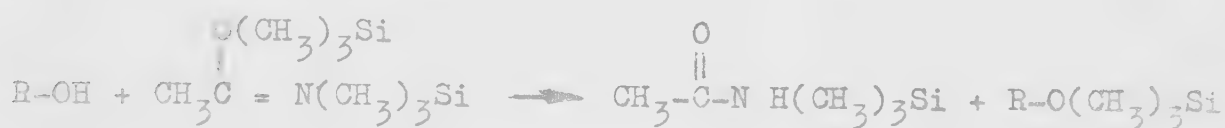
C'est sur ce type de dérivé que s'est porté notre choix.

a) Ethers de triméthylsilyle (TMS)

Ces dérivés furent décrits pour la première fois par LANGER (63) en 1958 et appliqués à l'analyse des stéroïdes hormonaux par le groupe de HORNING en 1961 (72). La conversion des stéroïdes hydroxylés en dérivés éthers de triméthylsilyle est quantitative et à l'exception des corticostéroïdes, ont un excellent comportement chromatographique.

La réaction de silylation a lieu en présence d'agents donneurs de groupements "silyle", tels le bis-triméthylsilylfluoroacétamide (BSTFA), bis-triméthylsilylacétamide (BSA), hexaméthylidisilazane (HMDS) et triméthylsilylimidazole (TSLi), pour ne citer que les plus connus.

La réaction de silylation avec le BSA par exemple, est la suivante :



Cette réaction peut être accélérée soit par des agents chimiques tels le triméthylchlorosilane (TMCS) ou les ions H^+ , soit par la chaleur, soit par leur emploi simultané.

La vitesse de la réaction de silylation est grandement conditionnée, par la position des groupements OH sur la molécule stéroïdienne.

La silylation de l'hydroxyle, en position 11β , peut être obtenue en 5 heures à la température ordinaire, en utilisant le BSTFA ou le BSA, avec 20 % V/V de catalyseur. Le même résultat est obtenu en 20 heures avec 2 % de catalyseur. La silylation de l'hydroxyle en 17α du prégnanetriol nécessite à la fois un catalyseur et un chauffage à $60^\circ C$ pendant 48 heures.

La vitesse de réaction est également affectée par le type d'agent silylant utilisé. HMDS seul possède une vitesse de réaction extrêmement lente, mais donne de bons résultats utilisé conjointement avec de la Pyridine et un catalyseur (MAKITA et WELLS, 1963)(69). Le BSA et BSTFA ont une action plus rapide et ne nécessitent pas l'emploi de catalyseur du moins en ce qui concerne les groupements OH non affectés d'un encombrement stérique marqué. Toutefois, il est nécessaire d'utiliser un solvant organique tel la Pyridine conjointement avec le BSA, pour solubiliser les molécules pentahydroxylées, insolubles dans le BSA seul. Il est à noter que les formes commerciales de BSTFA et de BSA, contiennent un peu de TMCS, présence dont il faudra tenir compte dans les réactions dites non catalysées.

Certains auteurs, tel ENGEL (34), utilisent une "hypersilylation" en chauffant le mélange stéroïde-BSTFA-TMCS à 75°C pendant 3 heures, suivie d'une purification sur une colonne de Séphadex LH 20 et d'une "resilylation" dans une atmosphère de Pyridine BSTFA à 75°C pendant une nuit. Le triméthylbromosilane a été également utilisé comme catalyseur de ces réactions (3) ; il est apparu comme beaucoup plus actif que le TMCS.

Sur une phase "polaire", telle OV-17, le temps de rétention d'un stéroïde possédant un ou plusieurs groupements hydroxyles est inversement proportionnel au nombre de groupements silyle fixé sur la molécule. Sur une colonne OV-1 non polaire, cette règle n'est vérifiée que pour les métabolites des corticostéroïdes et dans le cas d'au moins un groupement silyle, pour les métabolites de la progestérone. Cette différence de comportement fait, qu'en utilisant ces 2 colonnes simultanément, la silylation d'un nombre plus ou moins grand de groupements OH dans le cas de molécules polyhydroxylées, conditionnera une bonne séparation chromatographique.

Dans le cas de notre problème, les meilleures conditions de séparation ont été obtenues en ne silylant que

les groupements hydroxyles en position 3, 17 sec. et 21, résultat obtenu en mettant en présence du BSTFA et l'extrait urinaire pendant la nuit à la température ambiante (22°C).

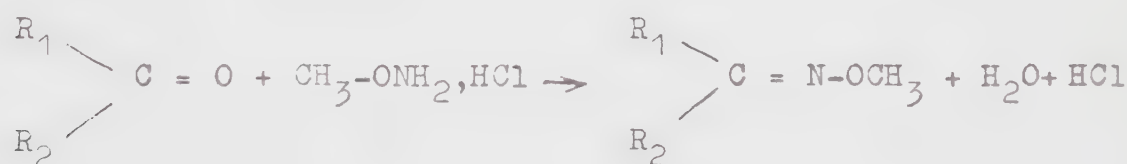
b) Dérivés méthyloximes (MO)

En 1965, FALLES et LUUKKAINEN (35) montrèrent que le chlorhydrate de O-Méthylhydroxylamine, pouvait réagir avec les stéroïdes possédant une ou plusieurs fonctions cétones, pour former un O-Méthyloxime ou Méthoxime.

Ces dérivés sont stables dans les conditions habituelles du laboratoire, possèdent d'excellentes propriétés chromatographiques ; la transformation des stéroïdes en dérivés Méthoximes est quantitative.

M.G. HORNING et col. en 1967 (50), F. DRAY et WELIKY en 1970 (30), étudièrent le comportement en phase gazeuse de ce type de dérivés, et leur cinétique de formation.

La réaction a lieu en milieu Pyridine, selon le processus suivant :



La réaction peut donner lieu à la formation de deux isomères SYN et ANTI.



C'est le cas en particulier des stéroïdes possédant une fonction cétone en position 3.

Par contre, les fonctions cétones en position 17 et 20, ne forment pas ce type d'isomères géométriques. Le fait est probablement dû à l'encombrement stérique affectant ces positions.

A la température ordinaire, la cétone en position 11 ne réagit pas, même après 72 heures de réaction, sauf dans le cas des 18 NOR stéroïdes (30), tandis que les fonctions cétones en position 3, 7, 16, 17 et 20 réagissent.

La formation de 2 isomères en position 3 est théoriquement très gênante pour l'analyse chromatographique. Pratiquement, dans le cas de notre problème, cet inconvénient n'existait pas, les stéroïdes possédant une cétone en 3 ne se trouvant dans l'urine qu'à des taux indétectables, par ce type de méthode. De plus, les isomères ne sont pas séparés sur une phase non sélective (OV-1) alors qu'ils le sont sur OV-17, ou après chromatographie en couche mince.

La réaction est complète en 15 heures à la température du laboratoire, ou 5 heures à 60°C.

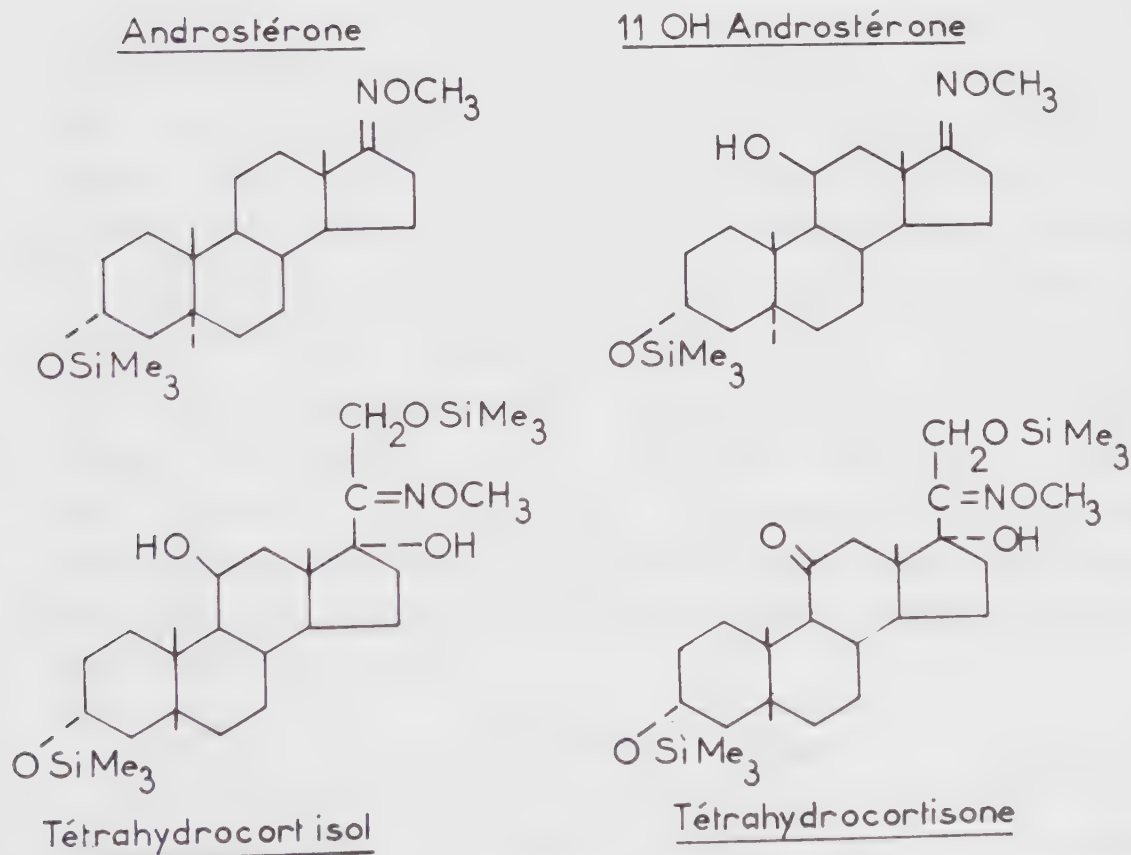
c) Dérivés mixtes : Méthyloximes-éther de triméthylsilyle (MO-TMS)

L'utilisation successive des dérivés méthyloximes, et des dérivés TMS permet la stabilisation de toutes les structures stéroïdiennes. Il est cependant impératif de les utiliser dans l'ordre ci-dessus. En effet, dans le cas des structures à chaîne latérale dihydroxyacétonique, la réaction de silylation initie un processus d'énolisation de la cétone en 20, décrit par CHAMBAZ et coll. (19), conduisant à des dérivés multiples. La présence de méthyloximes sur cette cétone permet donc d'éviter cette énolisation.

Il faut rappeler que la méthoxyamine présente dans le milieu réactionnel aussi bien que les ions H^+ provenant de la réaction, est un catalyseur puissant de la réaction de

silylation. De ce fait, l'obtention d'un dérivé TMS d'un stéroïde polyhydroxylé, non silylé en position 11β par exemple, nécessite l'élimination de l'excès de méthoxyamine. Cette élimination se fait par extraction du stéroïde MO par un solvant organique, tel l'acétate d'éthyle, puis lavage par une solution de bicarbonate de sodium. La silylation de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant organique, peut alors être menée, selon le processus indiqué plus haut.

La figure 18 montre les groupes fonctionnels atteints par les réactions de formation de méthyloximes et d'éther de triméthylsilyle dans les conditions que nous avons utilisées.



II - CARACTERISTIQUES DE NOTRE METHODE

1 - SPECIFICITE

Le principal problème de la chromatographie, en particulier de la chromatographie en phase gazeuse, telle que la méthode présentée ici, est la spécificité de la séparation.

En effet, considérant une colonne de chromatographie de polarité donnée, il est impossible à la seule vue d'un pic et de la mesure de son temps de rétention, d'affirmer son identité avec un quelconque composé connu, ni d'affirmer que le pic correspond à un seul composé.

Pour améliorer cette spécificité, on peut augmenter la résolution des colonnes, par l'introduction de nouveaux types de supports (billes de verre), ou par l'utilisation de colonnes capillaires (96). La spécificité peut également être obtenue en utilisant plusieurs colonnes garnies de phases stationnaires, de caractéristiques différentes, donnant ainsi d'un même mélange, des séparations différentes. En utilisant conjointement plusieurs types de colonnes et plusieurs types de dérivés, on peut ainsi arriver à caractériser un composé avec une grande certitude. Dans ce cadre, nous avons utilisé soit les dérivés TMS seuls, avec éventuellement des conditions de silylation différentes, permettant de mettre en évidence des groupements OH difficilement accessibles, soit les dérivés MO-TMS, et les dérivés TMS-énol-TMS (22) permettant la caractérisation des chaînes dihydroxyacétoniques.

Un autre moyen d'augmenter la spécificité peut être le système de détection, s'il est conçu pour réagir à des effluents de type particulier. C'est le cas des détecteurs coulométriques réagissant aux composés contenant du soufre ou du phosphore. Ce type de détecteur n'était pas utilisable dans le cas de notre problème.

La combinaison chromatographie-spectrométrie de masse, peut par contre être considérée comme un détecteur hautement spécifique puisque chaque composé peut être caractérisé par son spectre de masse, pouvant être comparé avec le spectre de référence d'un composé authentique.

Dans cette optique, la spectrométrie de masse utilisée comme détecteur, peut permettre la détection d'ions, caractéristique d'un composé donné dans un mélange et leur mesure quantitative (détection d'ion multiple) (44). La combinaison CG-SM apparaît actuellement dans ces possibilités, comme un ensemble analytique inégalé quant à sa spécificité pour l'étude des micro-échantillons biologiques (49).

La méthode de séparation ainsi étalonnée à partir des unités de méthylène d'un composé, déterminé sur 2 colonnes de polarité différente, et authentifié par les spectres de masse correspondants, permet une très grande spécificité. En fait, dans les extraits urinaires, il existe souvent des interférences avec d'autres stéroïdes présents en très faible quantité. Pratiquement, les métabolites mesurés contenaient moins de 5 % de "contaminants".

Moyennant cette légère restriction, il est possible de conclure à une bonne spécificité de cette méthode.

2 - REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité de la méthode a été établie en traitant un même extrait biologique, en 10 exemplaires, selon le protocole décrit précédemment. Les concentrations de chaque stéroïde considéré ont été calculées à partir des chromatogrammes obtenus sur 2 colonnes. La valeur finale retenue étant le minimum des valeurs de chacun des deux chromatogrammes.

Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

	Moyenne mg/24 h	Ecart- type	Coefficient de variation : %
Androstérone	2,28	0,07	3
Etiocholanolone	3,88	0,14	4
11-Céto Etiochol.	0,66	0,04	6
11-OH Androstérone	0,94	0,04	4,2
D.H.A.	2,14	0,11	5,1
Prégnanediol	1,1	0,06	5,4
Prégnanetriol	1,42	0,11	7,7
F.H.E.	6,3	0,43	6,8
T.H.F.	3,14	0,29	9,2
Allo-T.H.F.	2,89	0,13	4,4
β Cortolone	0,65	0,04	6,1

La méthode présentée ici permet la mesure simultanée des métabolites en C 19 (Androgènes) et en C 21 (les dérivés de la progestérone et les corticostéroïdes).

Les méthodes présentées dans la littérature, utilisant diverses méthodologies sont limitées soit à l'étude de quelques métabolites individuels, soit à un ensemble de métabolites, constituant un groupe biologique.

Pour cette raison, nous confronterons successivement nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, selon un découpage comprenant :

- a) Les métabolites des androgènes ;
- b) Les métabolites de la Progestérone ;
- c) Les métabolites des corticostéroïdes.

a) Métabolites des androgènes

Un grand nombre de méthodes d'évaluation individuelle des métabolites des androgènes a jusqu'ici été publié. Ces méthodes faisaient appel soit à la chromatographie en couche mince (Brooksbank, 1959) (15), soit à la chromatographie sur colonne (silice, gel, résine) (Drosdowsky, 1962, (31) ; Starnes, 1963, (86); Uozumi, 1969, (90); Kellie, 1957, (61); Feher, 1966, (36). Toutes ces méthodes de séparation étaient suivies d'élution et le dosage se faisait par la réaction de Zimmerman, caractéristique des groupes 17 cétoniques, adjacents aux groupements CH_2 .

Après les premières publications montrant la possibilité de séparer les métabolites des androgènes par chromatographie en phase gazeuse (Haati, 1961, (43) ; Cooper, 1961, (26) ; Vandenheuvel, 1962, (92). Les méthodes de séparation évoluèrent dans le sens d'une simplification du procédé (Moolenaar, 1971, (71), malgré une étape de purification préliminaire à la chromatographie en phase gazeuse (Kirshner, 1963, (58) ; France (39); Thomas (87) ; Kirshner, 1964, (59); Panicucci, 1965, (76) ; Riviera, 1967, (81); Heyns, 1968, (46).

La reproductibilité de ces différentes méthodes, quand il en était fait mention, était assez variable, selon les auteurs. On trouvera, dans le tableau suivant, quelques valeurs de la littérature.

Auteurs	Andro.	Etio.	DHA	11-C E	11-OH A
STARNES 1963 (*)	16 %	28 %	14 %	15 %	15 %
FRANCE 1965 (*)	1,5 %	4 %	1,8 %		
THOMAS 1965 (**)	8 %	14 %	19 %		
RIVERA 1967	6,2 %	7,2 %	8,2 %		
HEYNES 1968	7,2 %	10,7 %	7,1 %		
VÖLLMIN 1971 (***)	25 %	15 %	20 %	6 %	4,2 %
Méthode présentée	3 %	4 %	5,1 %		

(*) effectuée sur des standards.

(**) concentration en stéroïde identique à la notre.

(***) sur colonne capillaire (référence 96).

La méthode présentée ici donne donc d'excellents résultats quant à la reproductibilité des valeurs obtenues, tant par rapport aux méthodes colorimétriques que par rapport aux méthodes de chromatographie gazeuse.

b) Métabolites de la Progestérone

L'une des premières publications décrivant l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des métabolites de la progestérone, en particulier du prégnanediol, fut faite par Wotiz en 1963 (98), préconisant la chromatographie de l'acétate de prégnanediol.

A cette même date, Turner, (89) ; Jansen, (56) ; Cox, (28), décrivaient la possibilité de chromatographier le prégnanediol sous forme libre. Depuis, beaucoup d'autres méthodes furent publiées, utilisant en particulier les dérivés triméthylsilylés de prégnanediol, soit avec purification préliminaire (Raman, 1965 (78) ; Kirshner, 1963 (58), 1964 (59) ; Panicucci, 1965 (76) ; Rivera, 1967 (81), soit sous forme de dérivés TMS sans purification préliminaire (Hammond, 1967 (45) ; Moolenaar, 1971 (71), tandis que d'autres auteurs restaient fidèles à la chromatographie du prégnanediol sous forme libre (Cox, 1968 (27), ou sous forme acétylée (Chattoraj, 1967 (24).

Les méthodes colorimétriques gardaient néanmoins pour d'autres auteurs (Oertel, 1965 (74) ; Kraiem, 1969 (62), un certain intérêt.

Citons également une méthode de dosage simultané du prégnanediol et de l'oestriol, utilisant la chromatographie en couche mince préliminaire à la chromatographie en phase gazeuse, proposée par Brooks et coll. en 1967 (11).

Les reproductibilités de ces diverses méthodes sont relativement voisines à l'exception de celle de Rivera qui obtient d'excellents résultats. Notre méthode présente

néanmoins une bonne reproductibilité par rapport à ces diverses techniques. Nous avons résumé quelques valeurs de la littérature dans le tableau VIII.

Auteurs		Prégnanediol	Prégnanetriol
WOTIZ	1963	6 %	
JANSEN	1963	7,3 %	
COX	1967	7,3 %	
RIVERA	1967 (*)	3,2 % (*)	2,7 %
KRAIEM	1969	9 %	
VOLLMIN	1971 (**)	13 %	14 %
Méthode présentée,		5,4 %	7,7 %
(*) coefficient de variation calculé sur un taux de 4,32 mg de prégnanediol.			
(**) Colonne capillaire.			

Tableau VIII

c) Métabolites des corticostéroïdes

La séparation et le dosage des métabolites des corticostéroïdes, par une méthode de chromatographie en phase gazeuse se sont heurtés à l'instabilité de la chaîne latérale dihydroxyacétonique de certains de ces métabolites. Aussi, les principales techniques utilisées ont été basées sur la séparation et la quantification de ces composés par chromatographie sur papier ou sur colonne, suivies soit d'oxydation de la chaîne latérale permettant l'obtention des 17cétostéroïdes correspondants, tel Few, 1961 (37), soit la colorimétrie directe par la réaction de Porter et Silber, tels Starnes, 1963 (86); Pal, 1967 (75); Kraiem, 1969 (62); Uozumi, 1969 (90).

Cependant en 1964, Bailey (6) développa une méthode de dosage basée elle aussi sur l'oxydation de la chaîne latérale, mais suivie de la chromatographie en phase gazeuse des 17 cétostéroïdes correspondants. Sparagana en 1965 (85), utilise également ce genre de méthode. L'introduction des dérivés mixtes en 1964 par Gardiner et Horning (41), permit la chromatographie en phase gazeuse de ce type de composé, en conservant l'intégrité de leur structure.

Toutes ces méthodes sont extrêmement longues à réaliser en pratique. Néanmoins, les reproductibilités obtenues par différents auteurs sont relativement bonnes.

Auteurs	THE	THF	allo-THF	Cortolone
STARNES 1963	4,2 %	3 %	-	-
SPARAGANA 1965	5,5 %	10 %	10 %	-
PAL 1967	4,5 %	4,5 %	4,6 %	-
KRAIEM 1969	4,1 %	4,1 %	-	-
VÖLLMIN 1971 (*)	13 %	-	-	-
Méthode présentée	6,8 %	9,2 %	4,4 %	6,1 %
(*) colonne capillaire.				

La méthode présentée ici semble avoir pour les métabolites considérés, à l'exception de l'allo-THF, une reproductibilité un peu moins bonne que les méthodes colorimétriques citées. Ce fait est dû en grande partie à la sensibilité du type de dérivé utilisé vis-à-vis de l'état de la colonne de chromatographie. Cette méthode garde néanmoins une reproductibilité acceptable, eu égard à sa grande simplicité.

3 - SENSIBILITE

La sensibilité de notre méthode, avec l'appareillage utilisé et dans de bonnes conditions d'utilisation, est de l'ordre de 0,04 μ g de stéroïde injecté. En fait, la limite de détection est conditionnée, en l'absence d'intégration électronique, par la possibilité d'évaluation de l'aire des pics, avec une bonne précision. Cette précision devient d'ailleurs rapidement illusoire au-dessous d'une déviation de 50 mm. Mais il est toujours possible si l'on veut évaluer un pic de faible hauteur, soit de concentrer l'échantillon, soit d'augmenter la sensibilité de la détection, qui dans nos conditions opératoires, n'est utilisée qu'à une sensibilité 200 fois inférieure à la limite théorique.

4 - EXACTITUDE

L'exactitude a été établie par le rendement global de la méthode, mesuré sur la récupération du traceur radioactif. Avec le THF, le rendement moyen est de 67 %. Ce rendement est valable pour les composés de polarité voisine de celle du THF utilisé comme traceur. Nous avons effectué ce même type de mesure, en utilisant la testostérone marquée au ^{14}C , pour laquelle le rendement moyen était légèrement supérieur (75 %). En fait, ces résultats tiennent compte à la fois du rendement d'extraction des stéroïdes et des pertes "mécaniques" de la manipulation. En toute rigueur, il faudrait affecter à chaque stéroïde à mesurer, son homologue marqué, ce qui est irréalisable en pratique, cela conduisant à des problèmes de comptages insolubles.

Valeurs obtenues chez les sujets normaux.

Les valeurs normales de l'excrétion des métabolites neutres urinaires, ont été établies par un grand nombre d'auteurs. Ces valeurs sont dans l'ensemble assez variables, selon les méthodes utilisées ; les principales causes de ces

VALEURS FEMMES NORMALES

Références	Hydrolyse (1)	Purification (2)	Rendement		Mesure (4)	A	E	DHA	11-C E	11-OH A
			%	Correc- tion (3)						
RUBIN 1954	A	CP			col.	3,8	3,05	-	0,49	0,78
KAPAS 1955	E	CCM + CP			col.	1,4	2,2	-	0,50	0,45
BROOKSBANK 1959		CC			col.	3,5	3,2	1,5	1,00	1,45
STARINES 1963	E + S	CC + CP	70-100		col.	2,33	3,10	0,98	1,00	0,65
FEHER 1966	A	CP			col.	3,1	2,7	1,1	0,7	1,4
RIVERA 1967	E + S	CC	65-86		CPG	1,37	1,18	1,05	-	-
ROS 1968	E	-		SI	CPG	3,67	2,76	2,47	0,81	1,28
HEYNS 1968	E + S	CC	70-80		CPG	2,52	2,80	0,8	-	-
UOZUMI 1969	E + S	CC			col.	1,37	1,42	0,57	0,15	0,77
CERESA 1970	A	-		SI	CPG	3,95	3,74	0,91	0,50	0,62
CERESA 1970	E	-		SI	CPG	2,53	3,27	0,15	0,20	0,78
MOOLENAR 1971	A	-			CPG	2,56	2,33	0,21	0,39	0,76
Méthode présentée	E + S	-		T	CPG	2,04	2,32	0,34	0,55	0,56

(1) A = Hydrolyse acide
E = Enzymatique
S = Solvolyse

(2) CP = Chromatographie sur papier
*CCM = Chromatographie en couche mince
*CC = Chromatographie sur colonne

(3) = intégrée dans les résultats
SI = Standard interne
T = Traceur radio-actif

(4) col. = colorimétrie
CPG = Chromatographie en phase gazeuse.

* Tous types de supports : alumine, silicagel, résine, etc...

différences, peuvent tenir au type d'hydrolyse, à la purification des extraits, et au rendement des diverses opérations. Ce rendement, bien que souvent connu, n'est que très rarement incorporé dans l'évaluation finale des résultats.

Dans les tableaux IX et X, nous avons réuni quelques valeurs normales de la littérature, concernant l'élimination des stéroïdes en C-19, obtenues selon diverses modalités techniques. Les auteurs ayant utilisé une standardisation interne (Ros (86), Ceresa (17)), ont des résultats discordants entre eux. Ros trouve des valeurs de DHA extrêmement élevées chez les individus de sexe féminin, malgré l'absence de solvolysé, tandis que Ceresa évalue la DHA après une hydrolyse acide, et en trouve 5 fois plus environ que par une hydrolyse enzymatique seule ; ceci semblant indiquer une absence de spécificité de cette mesure, la DHA étant détruite à 60 % en 10 mn par hydrolyse acide (Cooper (26)), et pratiquement pas hydrolysée par les procédés enzymatiques. En effet, les sulfatases contenues dans la préparation enzymatique ne sont pas très actives.

Diverses valeurs concernant l'excrétion des stéroïdes en C-21 sont réunies dans les tableaux XI et XII. Les valeurs des métabolites de la progestérone (Pd et Pt), sont assez voisines de celles que nous trouvons. Les valeurs de l'élimination des corticostéroïdes chez les individus de sexe féminin, sont très voisines de celles trouvées par Ros, par contre, diffèrent assez sensiblement de celles déterminées par Starnes, Sparagana, Pal, Uozumi, et Kraiem. Ces différences peuvent être attribuées aux rendements des méthodes employées, très différents selon les auteurs.

VALEURS HOMMES NORMAUX

Références	Hydrolyse (1)	Purification (2)	Rendement		Mesure (4)	A	E	DHA	11-C E	11-OH A
			%	Correc- tion (3)						
RUBIN 1954	A	CP	-		col.	3,36	3,89	-	0,51	0,73
BROOKSBANK 1959		CC	-		col.	5,56	5,3	2,09	0,74	1,03
SPARKES 1963	E + S	CC + CP	72-100		col.	2,78	3,77	1,72	0,89	0,65
PANTUCCI 1965	E + S	CCM	100		CPG	3,44	3,26	1,87	0,20	0,27
FEHER 1966	A	CP			col.	3,4	2,8	2,3	0,6	1,6
RIVERA 1967	E + S	CC	65-86		CPG	2,16	1,5	0,58	-	-
HEYNS 1968	E + S	CC	70-80		CPG	3,97	3,02	1,92	-	-
UCZULT 1969	E + S	CC			col.	2,8	1,6	1,95	0,12	0,83
MOOLENAR 1971	A	-			CPG	4,78	3,3	0,94	0,39	0,98
Méthode présentée	E + S	-		T	CPG	3,35	3,20	1,20	0,51	0,70

(1) A = Hydrolyse acide
E = Enzymatique
S = Solvolysé

(2) CP = Chromatographie sur papier
*CCM = Chromatographie en couche mince
*CC = Chromatographie sur colonne

(3) = intégrée dans les résultats
SI = Standard interne
T = Traceur radio-actif

(4) col. = Colorimétrie
CPG = Chromatographie en phase gazeuse.

* Tous types de supports : alumine, silicagel, résine, etc...

VALEURS HOMMES NORMAUX

Références	Hydrolyse (1)	Purification (2)	Rendement		Mesure (4)	Pd	Pt	THF	THF	allo- THF	corn- tolon
			%	Correction (3)							
STARNES	1963	E + S	72-100		col.	-	-	3,06	2,19	0,92	-
PANICUCCI	1965	E + S	100		CPG	0,55	1,25				
SPARAGANA	1965	E	87-95		CPG	-	-	3,21	1,95	1,15	-
OERTEL	1965	E	74-92		col.	0,60	1,25				
RIVERA	1967	E + S	62-70		CPG	0,45	0,90				
PAL	1967	E + S	64-81		col.	-	-	3,4	2,8	1,5	
UOZUMI	1967	E + S			col.	-	-	2,2	1,9	0,9	
KRAIEM	1969	E	79-106		col.	-	-	2,8	1,1	0,4	
Méthode présentée		E + S		T	CPG	0,85	1,34	4,17	2,56	2,95	0,6

(1) A = Hydrolyse acide

E = Enzymatique

S = Solvolysé

(2) CP = Chromatographie sur papier

*CCM = Chromatographie en couche mince

*CC = Chromatographie sur colonne

(3) = intégrée dans les résultats

SI = Standard interne

T = Traceur radio-actif

(4) col. = Colorimétrie

CPG = Chromatographie en phase gazeuse.

* Tous types de supports : alumine, silicagel, résine, etc...

VALEURS FEMMES NORMALES

Références	Hydrolyse (1)	Purification (2)	Rendement		Mesure (4)	Pd	Pt	THE	THF	alio- THF	Cor- tolone
			%	Correction (3)							
STARRES 1963	E + S	CC + CP	70-100		col.	-	-	1,76	1,19	0,57	-
OERTEL 1965	E	CCM	64-92		col.	0,72	0,88				
RIVERA 1967	E + S	CC	62-70		CPG	-	1,06				
PAL 1967	E + S	CP	64-81		col.	-	-	3,2	2,6	1,2	
COX 1968	A	-	93		CPG	0,44					
COX 1968	A	-	93		CPG	3,22					
ROS 1968	E	-		SI	CPG	1 à 4,5	0,9 à 1,26	3,9	1,7	1,7	0,5
UOZUMI 1969	E + S	CC			col.	-		1,97	1,15	0,49	-
CERESA 1970	E	-		SI	CPG	0,99	0,78	2,96	3,04	0,88	0,45
Méthode présentée	E + S	-		T	CPG	(5)	(6)	3,58	1,16	1,60	0,5

- (1) A = Hydrolyse acide
E = Enzymatique
S = Solvolysé
- (2) CP = Chromatographie sur papier
*CCM = Chromatographie en couche mince
*CC = Chromatographie sur colonne

- (3) = intégrée dans les résultats
SI = Standard interne
T = Traceur radio-actif
- (4) col. = Colorimétrie
CPG = Chromatographie en phase gazeuse.

(5) (6) = Cf. tableau des valeurs au cours du cycle.

* Tous types de supports : alumine, silicagel, résine, etc...

En résumé, nous avons comparé notre méthode, tant sur le plan reproductibilité que sur le plan quantitatif, à plusieurs types de méthodes faisant appel à des estimations colorimétriques, et des estimations par chromatographie en phase gazeuse. La comparaison avec les méthodes par chromatographie en phase gazeuse, donc voisine de la notre, fait apparaître une reproductibilité et une spécificité très bonnes. L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique, associée à la solvolysé des éthers sulfates, la correction des pertes par l'utilisation de traceurs marqués, et l'évaluation des pics par standard interne, en font une méthode précise. La comparaison avec la longueur et la difficulté de réalisation des autres méthodes n'évaluant qu'un nombre limité de métabolites (androgènes, corticostéroïdes ou prégnanes), fait de notre méthode une technique rapide, permettant l'obtention simultanée de l'ensemble des métabolites neutres des stéroïdes urinaires.

APPLICATION EN RECHERCHE METABOLIQUE

La méthode que nous avons présentée, permet l'accès à la totalité de l'excrétion urinaire des métabolites neutres. Cet accès est à la fois quantitatif par l'estimation individuelle des différents métabolites, et qualitatif par la mise en évidence de composés qu'il n'était pas possible d'obtenir par les méthodes globales de détermination de groupes. Elle est plus précisément un outil de recherche métabolique.

Les mécanismes du métabolisme des hormones stéroïdes sont complexes. Ils peuvent être affectés au niveau de la biosynthèse par des déficits enzymatiques ; ils peuvent l'être également par l'action d'agents pharmacologiques pouvant agir au niveau de la biosynthèse ou du métabolisme périphérique sur les systèmes d'hydroxylation ou de réduction. La sécrétion stéroïdienne, elle-même, peut être perturbée au niveau des glandes productrices, par des processus tumoraux.

Ces perturbations, quels que soient les niveaux atteints provoquent au niveau de l'élimination urinaire, des modifications importantes des métabolites, tant sur le plan qualitatif (métabolites "anormaux") que sur le plan quantitatif, dont l'étude se révèle particulièrement intéressante, pour la compréhension du métabolisme lui-même.

Dans cette optique, nous avons appliqué notre méthode à l'étude des effets de quelques agents pharmacologiques, plus particulièrement de la Métopirone, de l'ACTH, de la Dexaméthasone, et du Nialamide, sur l'élimination des métabolites neutres urinaires. Nous l'avons également appliquée à l'étude des perturbations provoquées soit par des processus tumoraux, soit par des déficits congénitaux enzymatiques.

NOD... METO. I
 1% OV 101
 (180-270) x 1.2%mn
 MO-TMS

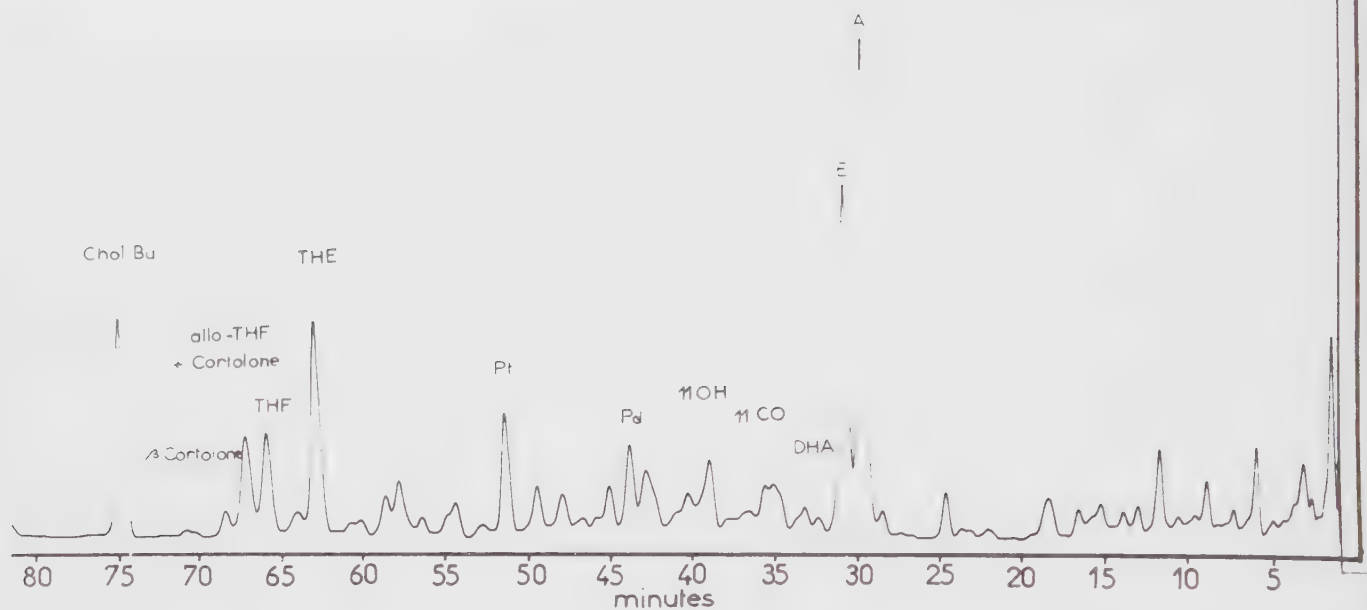


Figure 19

NOD... METO. II
 MO-TMS
 1% OV 101
 (180-270) x 1.2%mn

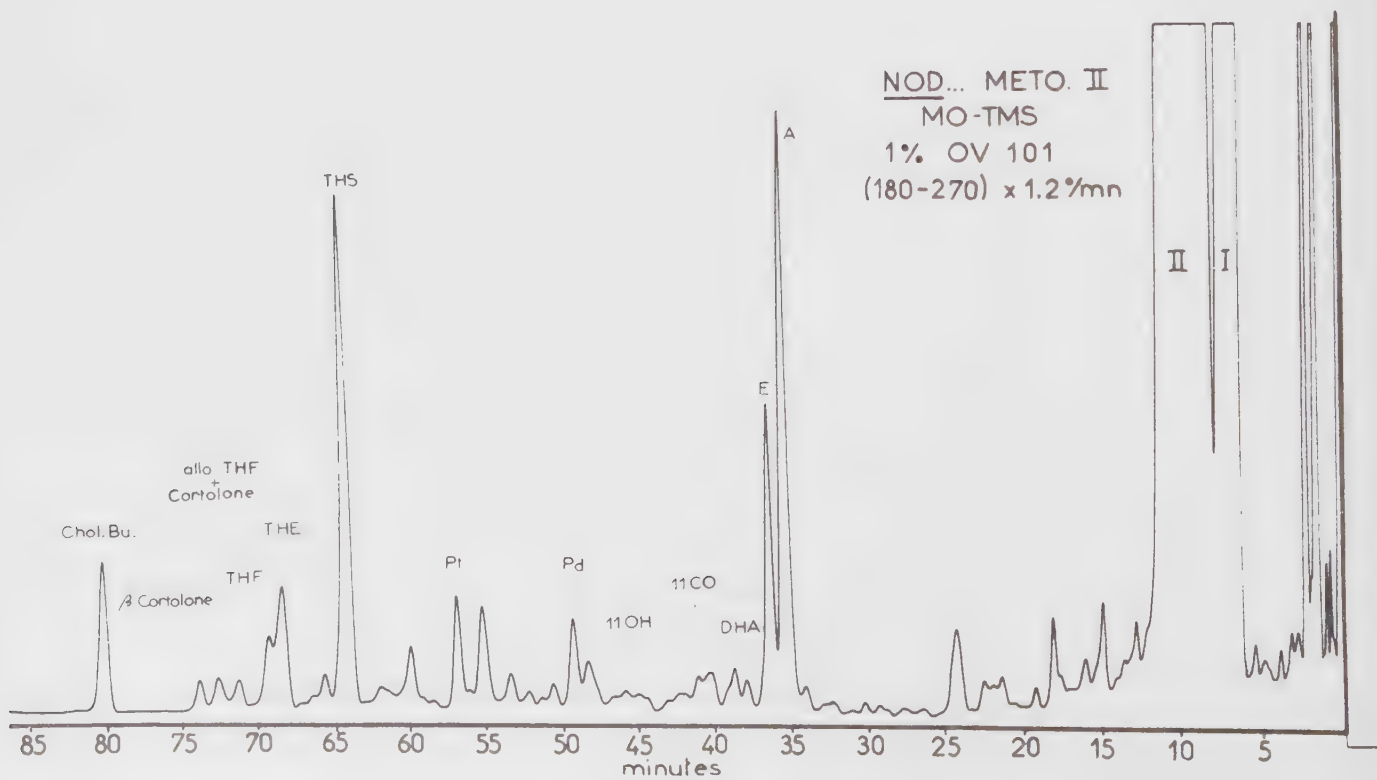


Figure 20

a. METOPIRONE (*)

La Métopirone, synthétisée en 1958 (23), est une substance chimique qui s'est révélée un inhibiteur particulier du système enzymatique conduisant à la 11 β hydroxylation, caractéristique du cortex surrénal. Le processus enzymatique conduisant à la sécrétion du cortisol étant bloqué (Cf. tableau du métabolisme), provoque, par un mécanisme de rétroaction, une hypersécrétion d'ACTH par l'hypophyse, entraînant une stimulation de plus en plus intense du cortex surrénal. Ceci est valable chez les espèces animales, où le cortisol est prédominant (homme), mais également dans le cas où la corticostérone est le corticostéroïde majeur.

La conséquence de ce mécanisme est la sécrétion importante du seul corticostéroïde non hydroxylé en 11 β possible, le composé S (11 désoxycortisol) éliminé sous la forme de son métabolite principal, le THS.

La Métopirone provoque donc un déficit enzymatique localisé, artificiel, permettant ainsi d'en étudier les conséquences au niveau du métabolisme. Les mécanismes de l'action de la Métopirone ont été étudiés par de nombreux auteurs, en particulier par Liddle (64, 65), Jenkins (55), et Roche (79), ainsi que ses effets sur le métabolisme stéroïdien par Hollub (47) et Norman (73). Il en ressort que la drogue inhibe également partiellement d'autres hydroxylases, en particulier en 18.

La méthode décrite précédemment, appliquée à l'étude de l'excrétion urinaire avant et après action de la Métopirone, peut être illustrée par les figures 19, 20 et 21.

Le "profil" de la figure 19 réalisé avant administration de Métopirone, est l'élimination urinaire normale.

(*) Métopirone : 2 méthyl-1,2 bis (3 Pyridil) 1 propanone, ou SU 4885, marque commerciale de Ciba.

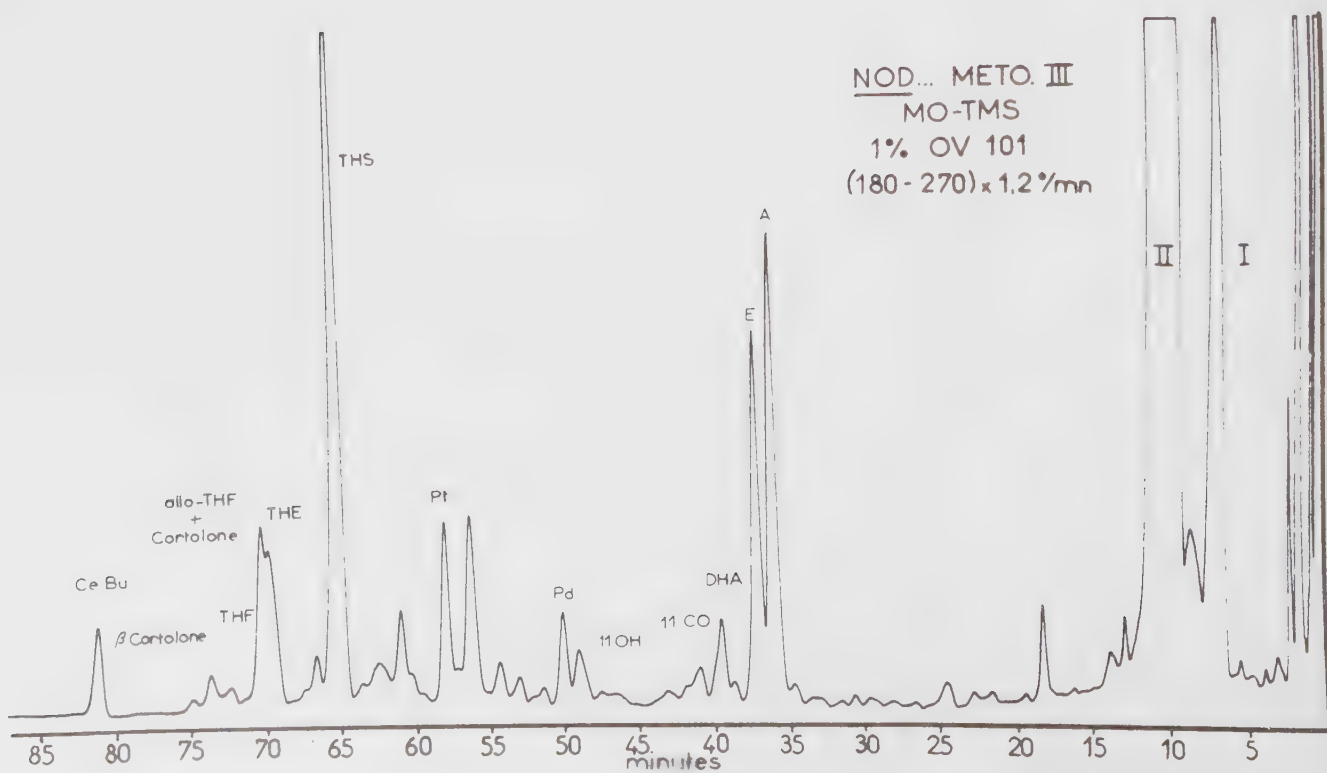
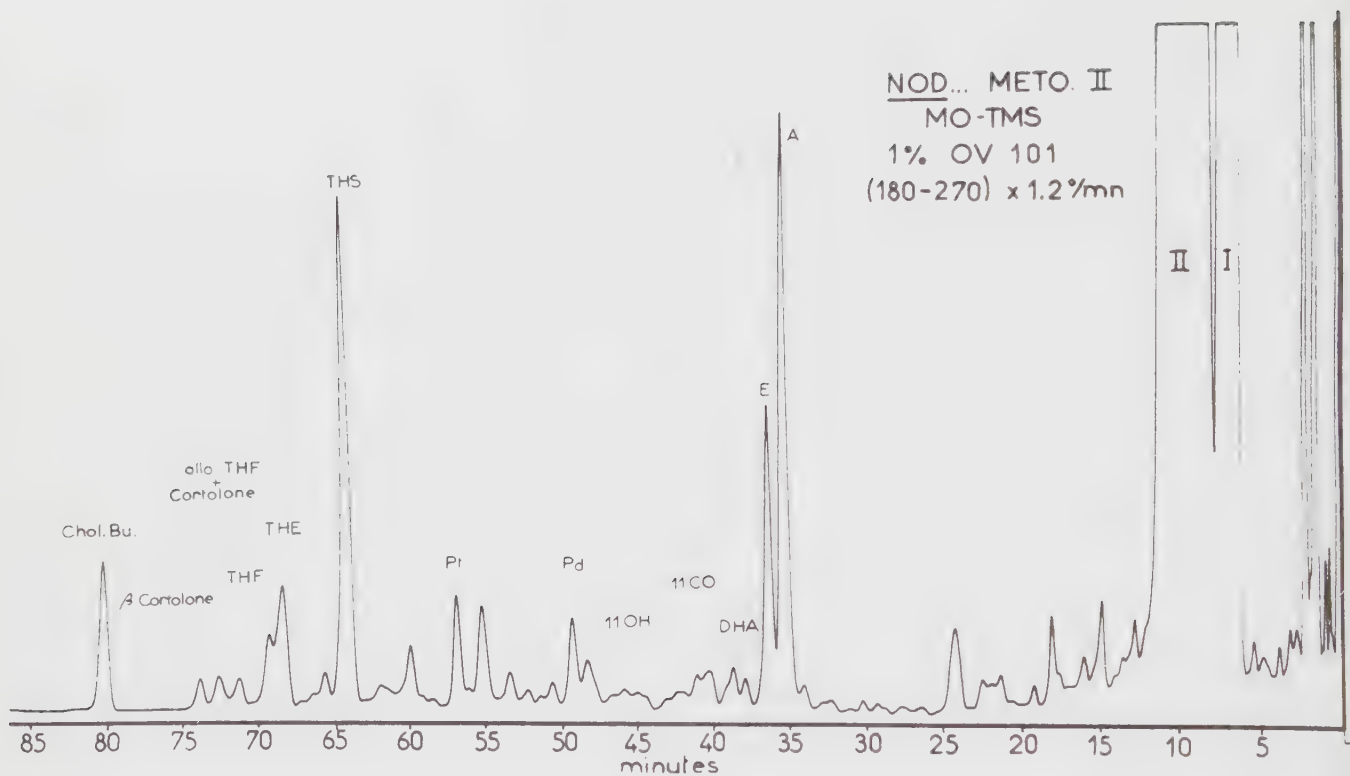


Figure 2I

Sur le "profil" de la figure 20, apparaît en quantité déjà importante, le pic correspondant à l'excrétion du THS ; on note en début de chromatogramme, l'apparition de 2 pics importants I et II. La spectrométrie de masse a permis de montrer que l'un de ces pics est le "Métopirol", forme réduite de la Métopirone.

On note également la disparition progressive des métabolites 11 hydroxylés, tandis que l'action de l'ACTH endogène se traduit par une élévation des métabolites des androgènes.

Le "profil" de la figure 21 mis en correspondance avec le profil témoin, permet de voir la disparition quasi totale de tous les métabolites hydroxylés en 11 β , tandis que l'excrétion du THS atteint son taux maximum, ainsi que celle des androgènes tandis que la Métopirone s'élimine lentement. Un exemple de valeurs de l'excrétion urinaire est donné dans le tableau suivant :

	A	E	DHA	11-OH A	THS	THE	THF
Avant Métopirone	7,8	5,1	0,3	1,5	0,1	6,7	4
			mg/24 heures				
Après Métopirone	13	6,6	0,8	0,1	22,1	5,5	1,8
			mg/24 heures				

b. A.C.T.H. (*)

L'ACTH est une hormone polypeptidique comprenant 39 acides aminés sécrétée par l'hypophyse antérieure. Son rôle est essentiellement la stimulation du cortex surrénal aussi

(*) A.C.T.H. : Adréno Corticotrophic Hormone.

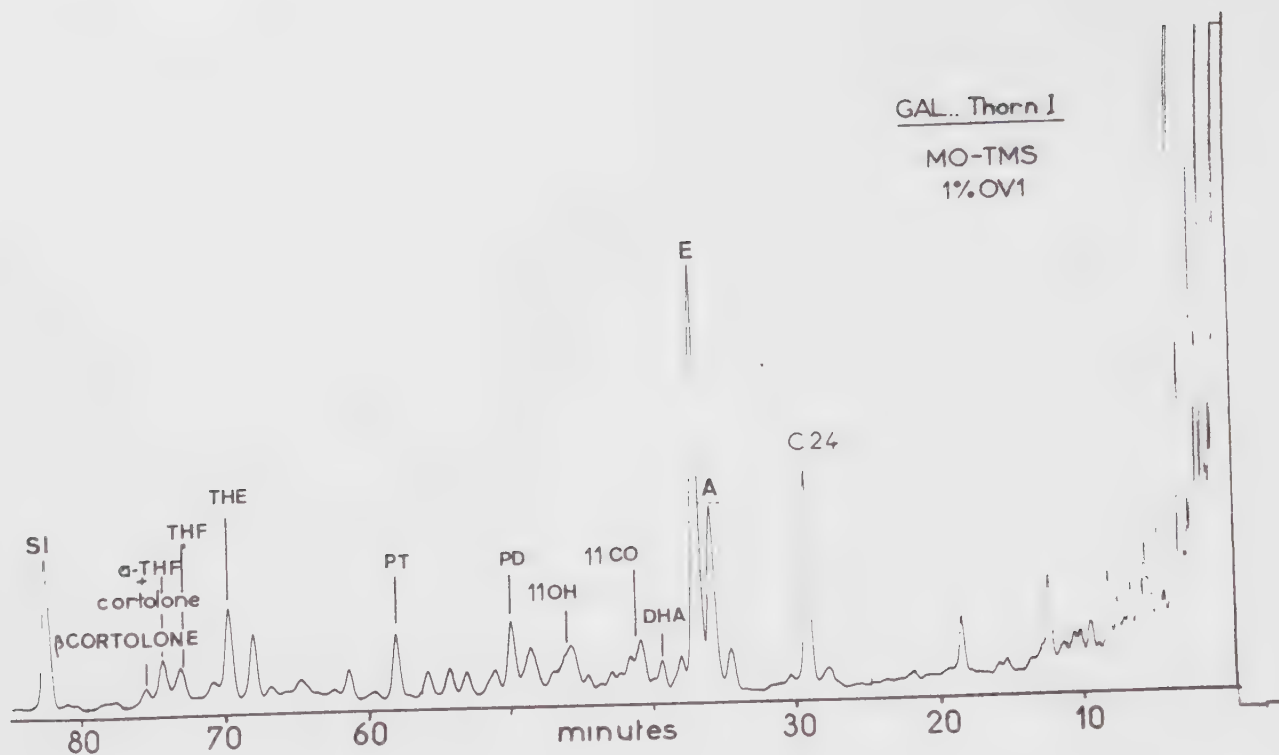


Figure 22

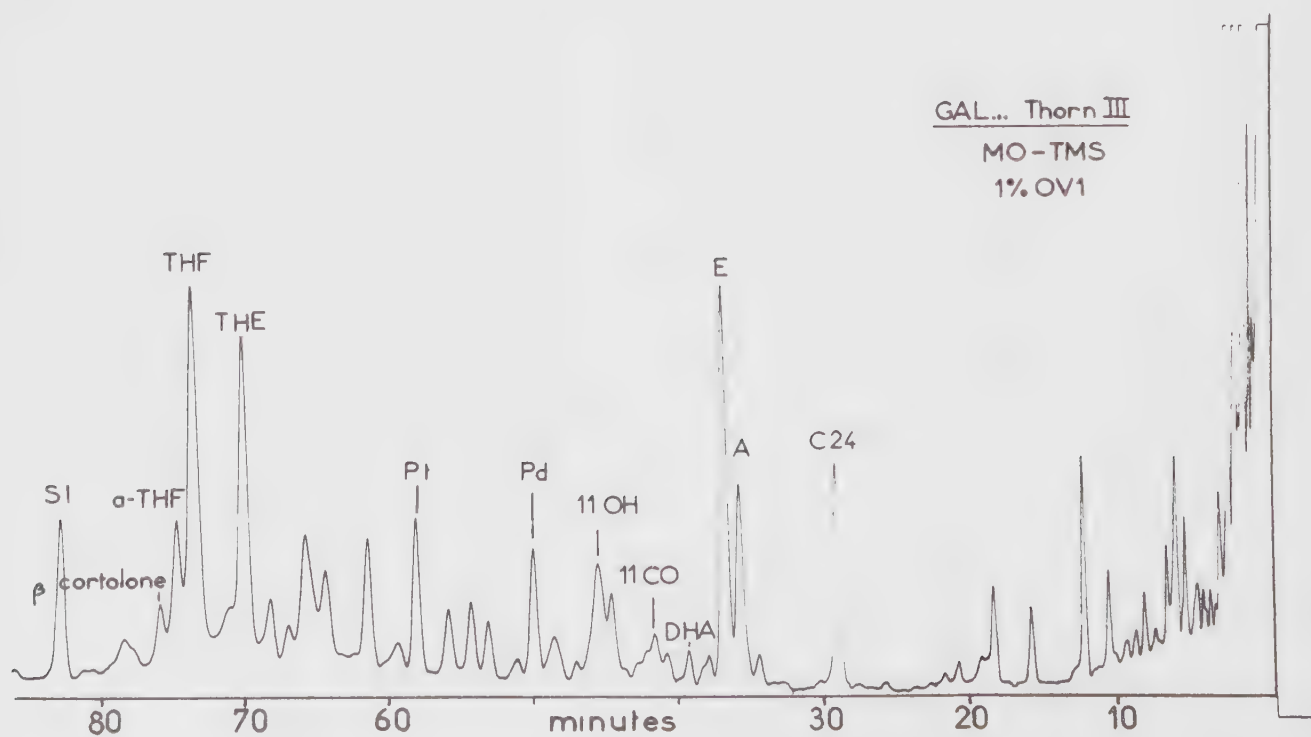


Figure 23

bien trophique que biosynthétique. Une élévation de son taux de sécrétion entraîne un hyperfonctionnement de la glande surrénale, conduisant principalement à une sécrétion augmentée de cortisol ; celui-ci faisant intervenir le mécanisme de rétroaction, tend à freiner l'action de l'hypophyse. Ainsi, utilisant de l'ACTH exogène (naturel ou synthétique), il est possible de freiner en grande partie la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse, et d'étudier le fonctionnement de la glande surrénale stimulée uniquement par apport extérieur d'ACTH. Les études de l'action de l'ACTH ont fait l'objet de nombreuses publications, notamment par Birke (9), Jenkins (54,55) et par Thorn (88) ; l'étude de l'action de l'ACTH exogène naturel sur la sécrétion des androgènes a été faite en particulier par Baulieu (4), tandis qu'Arguelles (2), étudiait l'action d'un analogue synthétique de l'ACTH.

Nous avons appliqué la méthodologie en phase gazeuse à l'étude des modifications métaboliques induites par l'action de l'ACTH exogène. Un exemple des résultats obtenus est illustré par les "profils" d'élimination urinaire des figures 22 et 23.

La figure 22 représente le profil d'élimination normal ; celui de la figure 23, l'excrétion urinaire après action de l'ACTH. On note sur ce dernier l'élimination massive des métabolites corticosurrénaliens. Sur cet exemple, les taux d'excrétion de quelques métabolites sont donnés dans le tableau suivant :

	A	E	DHA	11-OH A	THE	THF	allo- THF
Avant ACTH	2,08	4,27	0,56 mg/24 heures	0,95	2,26	1,36	2,68
Après ACTH	3,2	5,7	0,64 mg/24 heures	3,04	10,46	18,24	10

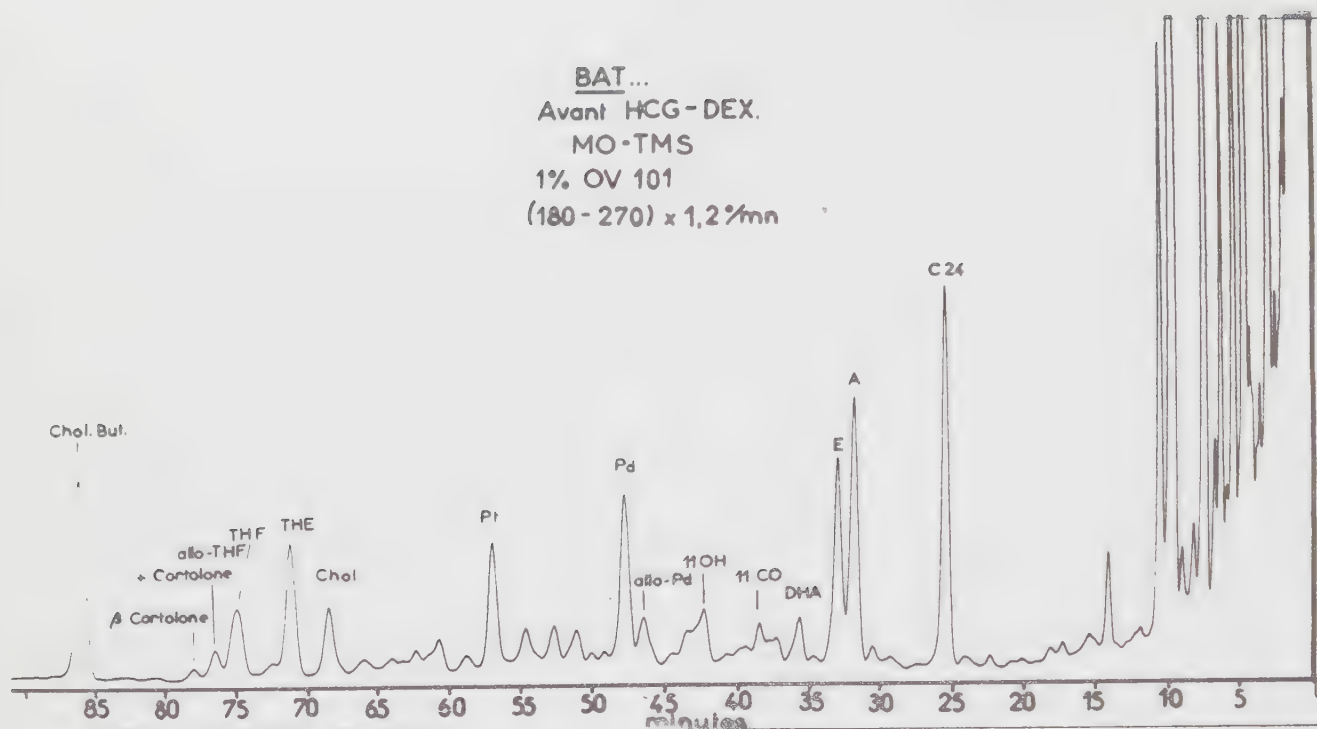


Figure 25

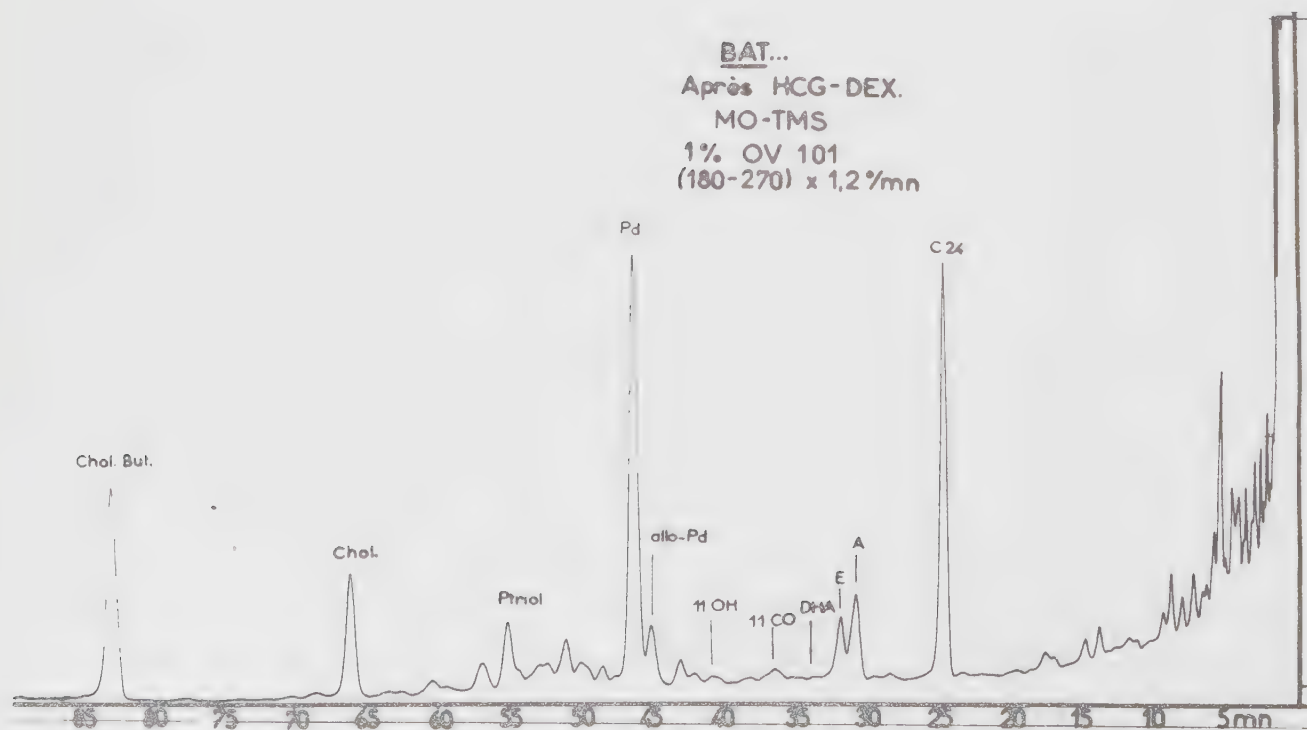


Figure 26

c. DEXAMETHASONE (*)

La Dexaméthasone, corticostéroïde de synthèse, possède un mode d'action très voisin de celui du cortisol. De ce fait, c'est un inhibiteur de la sécrétion hypophysaire par le biais du même mécanisme de rétroaction que celui mis en jeu par le cortisol. L'action de la Dexaméthasone sur l'excrétion des métabolites des androgènes a été étudiée par Mahesh (68) en particulier, et sur l'excrétion des métabolites des corticostéroïdes par Liddle (66) et Mahesh (68). Berthold (7) a étudié ses effets in vitro sur l'hypophyse elle-même. La Dexaméthasone provoque donc un freinage important au niveau de la corticosurrénale, dû à la disparition de la sécrétion d'ACTH. Il est alors possible en utilisant un stimulant de la sécrétion gonadique, telle que l'hormone chorionique humaine, d'étudier cette sécrétion, en dehors de toute stimulation interne. Ce type d'utilisation conjugué a été codifié par Jayle (52, 53), en ce qui concerne particulièrement les doses respectives de Dexaméthasone et d'HCG chez l'homme.

Nous avons appliqué notre méthode à l'étude de l'excrétion urinaire chez des sujets soumis au freinage surrénalien suivi de la stimulation par HCG. La figure 25 représente un exemple d'excrétion normale. La figure 26 montre le profil d'élimination après action conjuguée de la Dexaméthasone-HCG. On note la disparition totale des métabolites des corticostéroïdes et un abaissement important des métabolites des androgènes, tandis que le taux de prégnanediol augmente d'une manière importante.

(*) Dexaméthasone : 16 Méthyl 9 Fluoro Δ_1 Cortisol, commercialisée sous les noms de DECADRON et DECTANCYL.

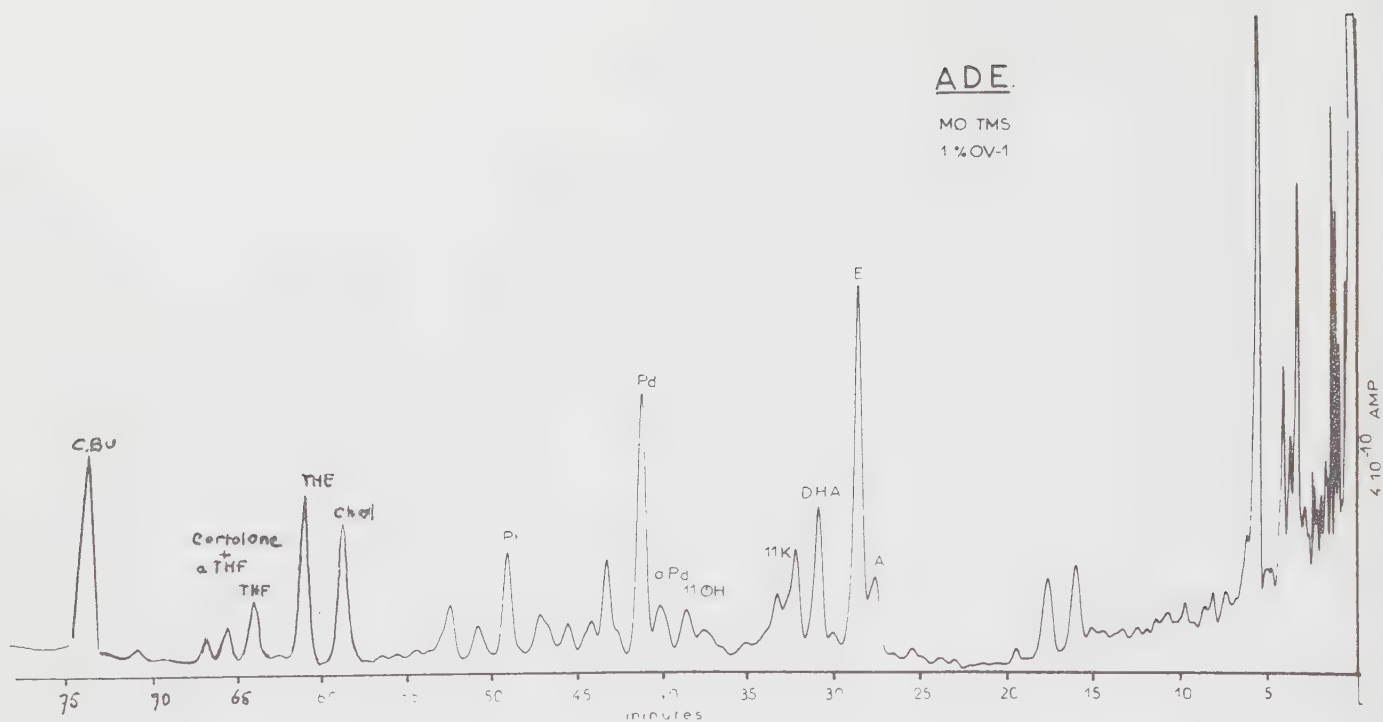


Figure 27

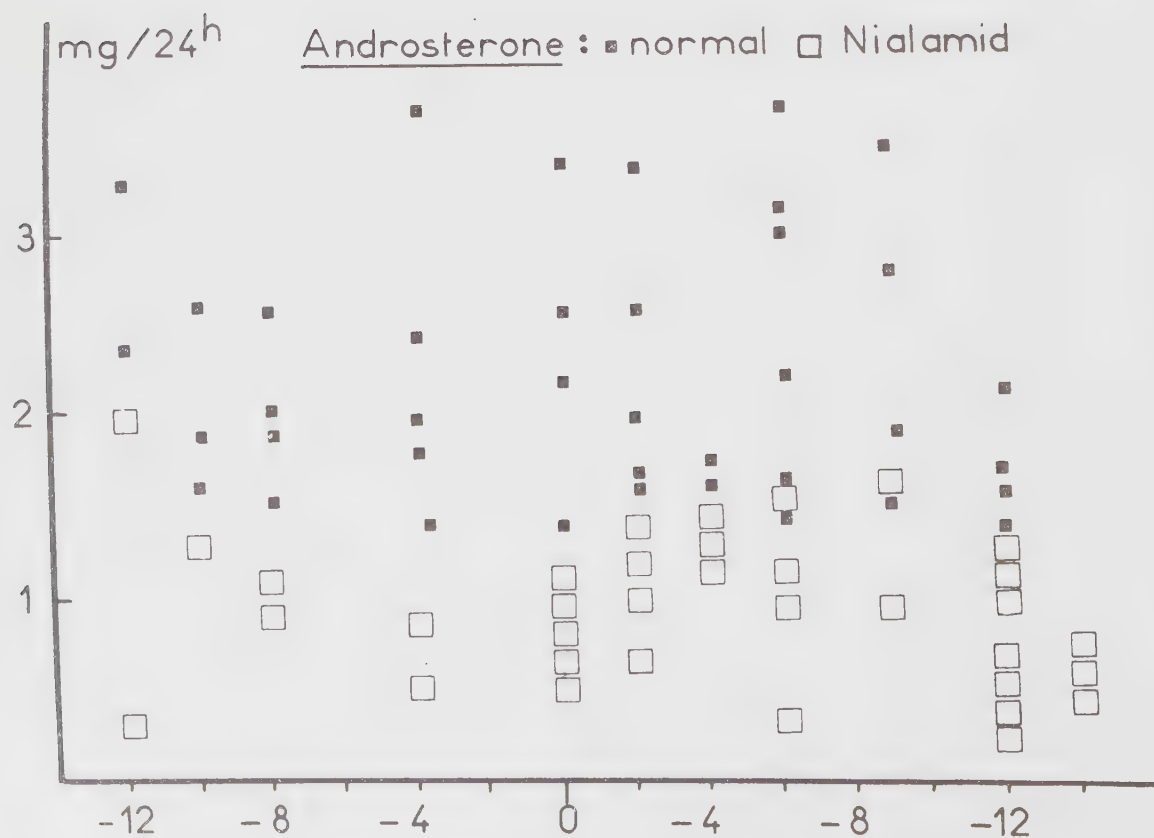


Figure 28

Un exemple des valeurs obtenues est résumé dans le tableau suivant :

	A	E	DHA	Pd	Pt	THE	THF
Avant Dexaméth.-HCG	4,46	3,37	0,67 mg/24 heures	2,8	2,2	5,36	3,36
Après Dexaméth.-HCG	1,24	0,52	- mg/24 heures	6,02	1,2	-	-

d . NIALAMIDE (*)

Le Nialamide est un inhibiteur de la monoamine oxydase conduisant particulièrement à un blocage du métabolisme de la sérotonine et des catécholamines. Il a pu être proposé pour le traitement de la stérilité chez la femme, pour son action sur la sécrétion de l'hormone lutéinisante par l'hypophyse antérieure (GAUTRAY, 1970 (40)).

Les modifications du métabolisme des stéroïdes hormonaux induites par le Nialamide ont déjà été publiées (40). Cette modification porte essentiellement sur l'élimination de l'androstérone, dont les taux après traitement au Nialamide sont considérablement abaissés. La figure 27 montre un exemple de profil d'élimination urinaire de femme traitée au Nialamide.

La figure 28 représente les valeurs de l'élimination de l'androstérone chez des femmes avant et après traitement.

La discussion du mécanisme de ces effets sort du cadre de ce travail.

(*) Nialamide : (Benzylcarbamoyl)₂ éthyl 1 isonicotinoyl
2 Hydrazine.

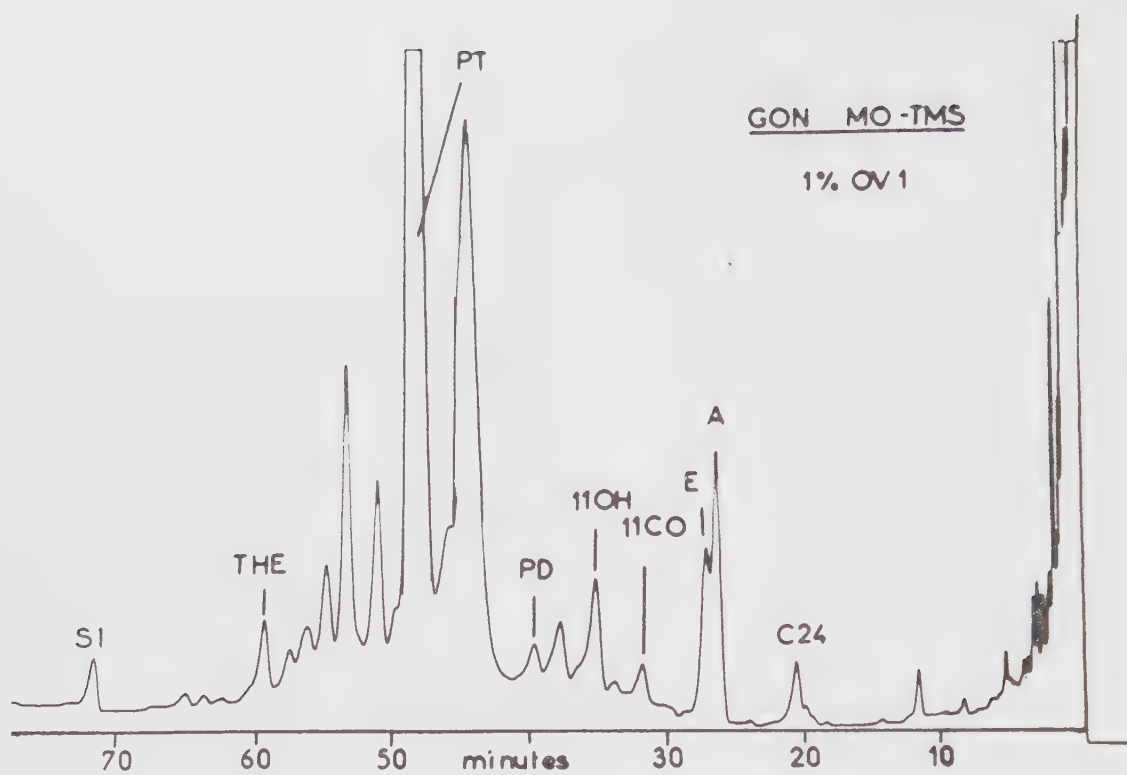


Figure 29

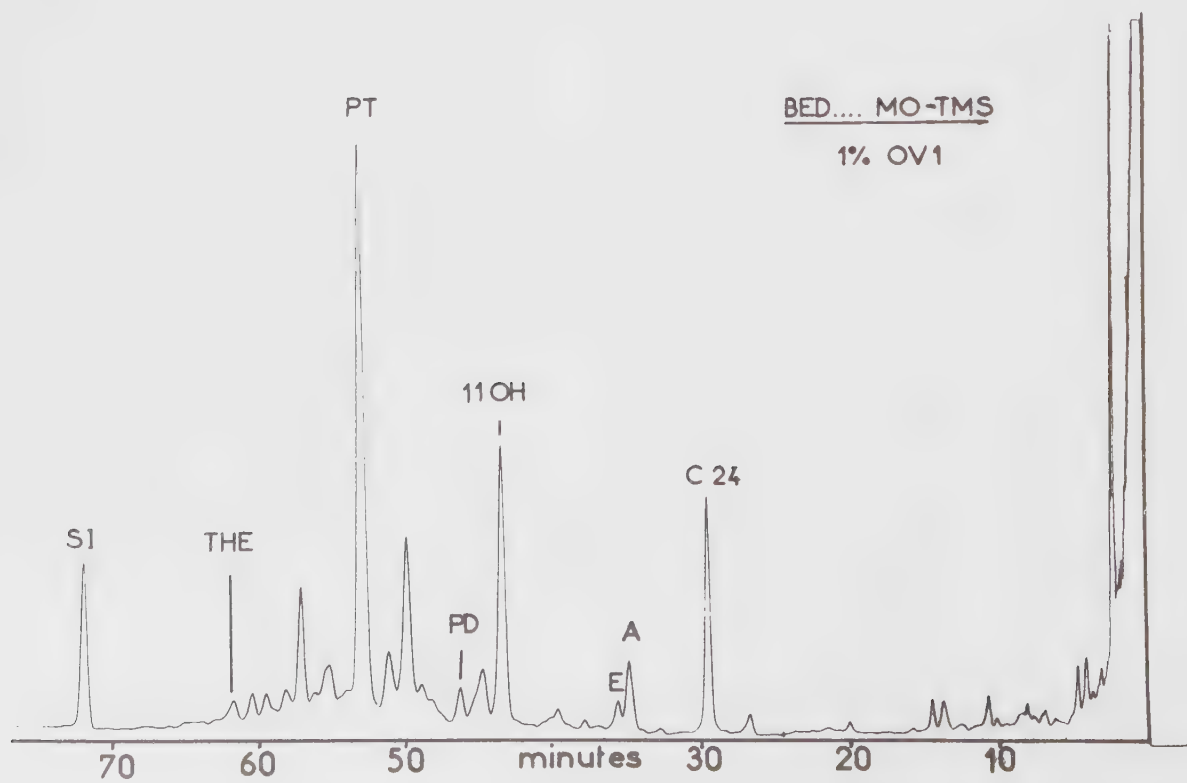


Figure 30

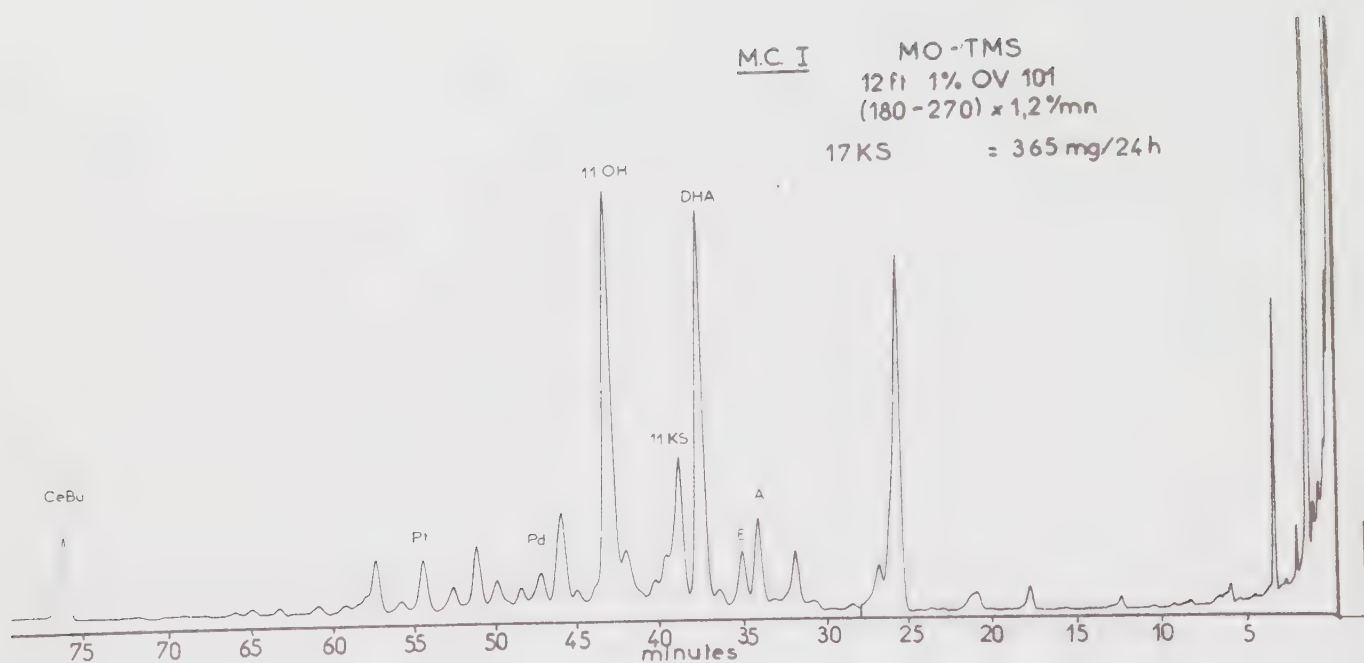


Figure 31

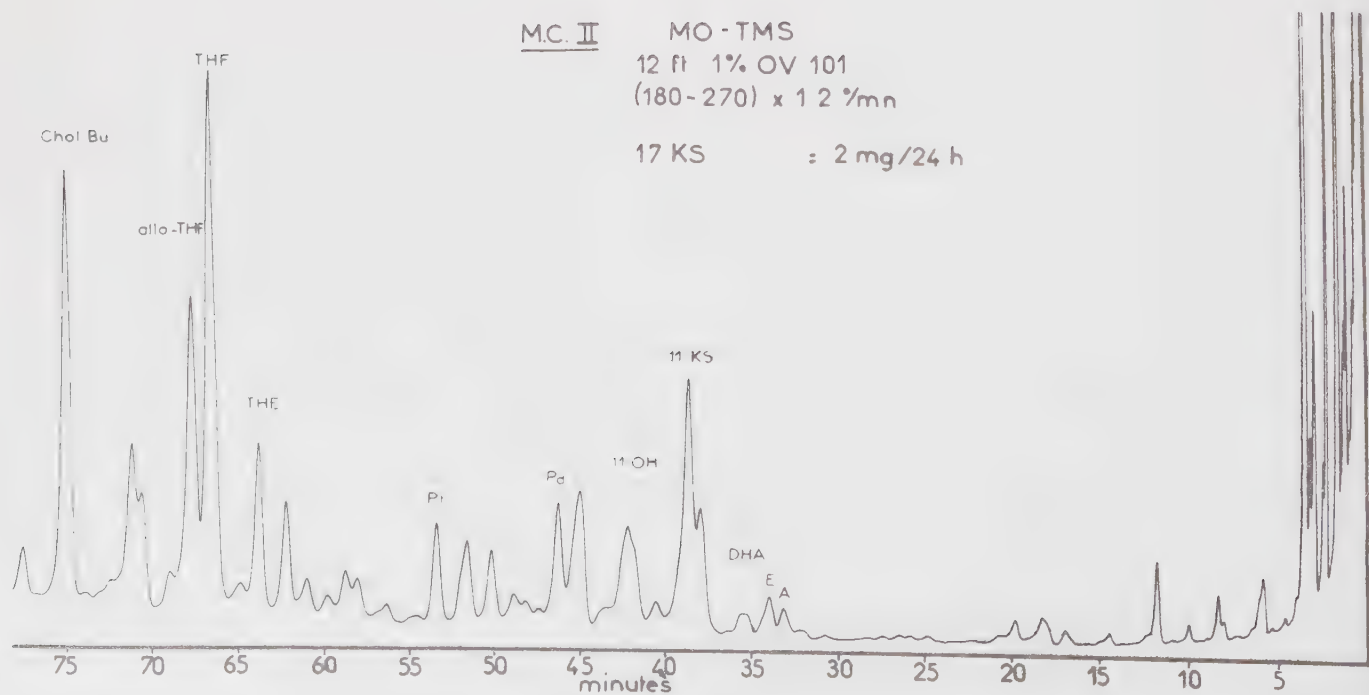


Figure 32

3. TROUBLES DU METABOLISME D'ORIGINE TUMORALE

Les troubles du métabolisme d'origine tumorale donnent lieu à des aspects caricaturaux au niveau de l'élimination urinaire. La figure 31 illustre un profil d'élimination urinaire d'une tumeur surrénalienne. On note l'importance de l'élimination de la DHA et des dérivés 11 cétoniques et 11 hydroxylés des androgènes. Ce type d'élimination signant l'origine surrénalienne (Cf. tableau du métabolisme).

La figure 32 illustre le changement intervenant dans le profil d'élimination après disparition de l'élément tumoral. L'élévation considérable des métabolites des corticostéroïdes (THE, THF, allo-THF) provient de l'élimination de la cortisone utilisée en traitement post-opératoire. On note le rétablissement à la normale de l'élimination des androgènes.

C O N C L U S I O N

Dans ce travail, nous nous sommes attachés à développer et à codifier l'utilisation d'une méthode d'analyse en phase gazeuse, pour l'étude des stéroïdes hormonaux.

Les diverses conditions d'utilisation des dérivés, nécessaires à la stabilisation de certaines structures, étant réalisées, nous avons montré la spécificité de cette méthode, par l'utilisation simultanée de deux types de colonnes et par la spectrométrie de masse des composés étudiés.

La reproductibilité de notre méthode et son exactitude établie par l'utilisation de traceurs marqués, sont apparues satisfaisantes.

La comparaison avec d'autres techniques de dosage n'ayant accès qu'à un type donné de composé, ou à un groupe particulier de stéroïdes, fait de cette méthode un moyen d'accès à un véritable "profil métabolique" des stéroïdes hormonaux.

Nous avons utilisé cette méthodologie pour étudier les variations physiologiques de l'élimination des stéroïdes urinaires, chez l'homme et chez la femme au cours du cycle menstruel.

L'application de cette méthode a ainsi rendu possible l'étude du métabolisme des stéroïdes dans des cas particuliers.

Les résultats obtenus font de cette méthode un outil de recherche métabolique très intéressant.

Ses possibilités apparaissent considérables dans le cadre de la caractérisation de métabolites inconnus, leur séparation et leur mesure, par son intégration systématique à un ensemble chromatographie-spectrométrie de masse.

B I B L I O G R A P H I E

1. ANTHONY, G.M. ; BROOKS, C.J.W. ; MACLEAN, I. ;
SANGSTER, I.
J. Chromatog. Sci. 1969, 7, 623
2. ARGUELLES, A.E. ; CHEKERDEMIAN, M. ; RICCA, A. ;
CARDINALI, D.P.
J. Clin. Endocr. 1964, 24, 1277
3. ARINGER, L. ; ENEROTH, P. ; GUSTAFSSON, J.A. ;
Steroids 1971, 17, 378
4. BAULIEU, E.E.
J. Clin. Endocr. 1960, 20, 900
5. BAULIEU, E.E. ; CORPECHOT, C. ; DRAY, F. ; EMILIOZZI, R. ;
LEBEAU, M.C. ; MAUVAIS-JARVIS, P. ; ROBEL, P.
Rec. Prog. in Horm. Res. 1965, 21, 411
6. BAILEY, E.
J. Endocr. 1964, 28, 131
7. BERTHOLD, K. ; ARIMURA, A. ; SCHALLY, A.V.
Acta Endocr. 1970, 63, 431
8. BERTHUIS, R.K. ; RECOURT, J.H.
Nature 1960, 186, 372
9. BIRKE, G. ; DICZFALUZY, E. ; PLANTIN, L.O.
J. Clin. Endocr. 1958, 18, 736
10. BLOCH, K.
Science 1965, 150, 19

11. BROOKS, C.J.W. ; CHAMBAZ, E.M. ; HORNING, E.C. ;
Anal. Biochem. 1967, 19, 234
12. BROOKS, C.J.W.
Anal. Chem. 1965, 37, 636
13. BROOKS, C.J.W. ; WATSON, J.
7th International Symposium on gas chromatography
C.L.A. Harbourn and R. Stocks Edts.
Institute of Petroleum, London, 1968, n° 8
14. BROOKS, C.J.W. ; HORNING, E.C. ; YOUNG, J.S.
Lipids 1968, 3, 391
15. BROOKSBANK, B.W.L. ; SALOKANGAS, A.
Acta Endocr. 1959, 30, 21
16. CEDARD, L.
Les oestrogènes naturels, biosynthèse et métabolisme.
Masson, Paris 1965.
17. CERESA, F. ; MOLINO, G. ; GAIDANO, G.P. ; MARINO, M.
Rev. Franç. Endocr. Clin. 1970. 11, 3
18. CHAMBAZ, E.M. ; MAUME, G. ; MAUME, B. ; HORNING, E.C.
Analytical Letters, 1968, 1, 749
19. CHAMBAZ, E.M. ; HORNING, E.C.
Analytical Letters, 1967, 1, 201
20. CHAMBAZ, E.M. ; HORNING, E.C.
Anal. Biochem. 1969, 30, 7
21. CHAMBAZ, E.M. ; MADANI, C.
Rev. Franç. Gynéc. 1970, 65, 263
22. CHAMBAZ, E.M. ; MADANI, C.
Excerpta Medica International Congress, Séries N° 210
page 97.

23. CHART, J.J. ; SHEPPARD, H. ; ALLEN, M.J.; BENCZE, W.C. ;
GAUNT, R.
Experientia 1958, 14, 151
24. CHATTORAJ, S.C. ; SCOMMEGNA, A.;
Steroids 1967, 2, 327
25. CHEN, C. ; LANTZ, C.D.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 1960, 3, 182.
26. COOPER, J.A. ; CREECH, B.G.
Anal. Biochem. 1961, 2, 502
27. COX, R.I.
in Chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes
hormonaux.
Dunod, Paris, 1968, p. 309
28. COX, R.I.
J. Chromatog. 1963, 12, 242
29. DORFMANN, R.I. ; UNGAR, F.
Metabolism of steroids hormones
Acad. Press, N.Y. 1965
30. DRAY, F. ; WELIKY, I.
Anal. Biochem. 1970, 34, 387
31. DROSDOWSKI, M.V. ; SCHOLLER, R. ; JAYLE, M.F.
in Analyse des stéroïdes hormonaux.
Masson, Paris 1962, tome II, p. 64
32. EGLINGTON, G. ; HAMILTON, R.J. ; HODGES, R.;
RAPHAEL, R.A.
Chem. Ind. 1959, page 955
33. EIK-NES, K.B. ; HALL, P.F.
Vitamines and Hormones 1965, 23, 153

34. ENGEL, L.L. ; NEVILLE, A.M. ; ORR, J.C. ; RAGATT, P.R.
Steroids 1970, 16, 377
35. FALES, H.M. ; LUUKKAINEN, T.
Anal. Chem. 1965, 37, 955
36. FEHER, T.
Clin. Chim. Acta 1966, 14, 91
37. FEW, J.D.
J. Endocr. 1961, 22, 31
38. FOTHERBY, K.
Vitamines and Hormones 1964, 22, 153
39. FRANCE, J.T. ; RIVERA, R. ; McNIVEN, N.L. ;
DORFMAN, R.I.
Steroids 1965, 5, 687
40. GAUTRAY, J.P. ; MADANI, C. ; CHAMBAZ, E.M.
3rd Int. Congress on Hormone Steroid. Hamburg 1970
41. GARDINER, W.L. ; HORNING, E.C.
Biochim. Biophys. Acta 1966, 115, 524
42. GURPIDE, E. ; MacDONALD, P.C. ; CHAPDELAIN, A. ;
VAN DE WIELE, R.L. ; LIEBERMAN, S.
J. Clin. Endocr. 1965, 25, 1537
43. HAATI, E.O. ; VANDENHEUVEL, W.J.A. ; HORNING, E.C. ;
Anal. Biochem. 1961, 2, 182
44. HAMMAR, C.G. ; HOLMSTEDT, B. ; RYHAGE, R.
Anal. Biochem. 1968, 25, 532
45. HAMMOND, K.B. ; LEACH, H.
Clin. Chim. Acta, 1967, 15, 145

46. HEYNS, W.
in Chromatographie des stéroïdes hormonaux
Dunod, Paris 1968, page 309
47. HOLUB, D.A. ; JAILER, J.W. ; KITAY, J.I. ; FRANTZ, A.G.
J. Clin. Endocr. 1959, 19, 1540
48. HORNING, E.C. ; VANDENHEUVEL, W.J.A. ; CREECH, B.G.
Methods of Biochemical Analysis
Interscience Publ. New-York 1963, vol. II, 69
49. HORNING, E.C. ; HORNING, M.G.
J. Chromat. Sci. 1971, 9, 129
50. HORNING, M.G. ; MOSS, A.M. ; HORNING, E.C.
Anal. Biochem. 1968, 22, 284
51. HORTON, R. ; TAIT, J.F.
Second Symposium on Steroids Hormones
Excerpta Medica, Série 101, 1966, page 199
52. JAYLE, M.F.
Rev. Franç. Endocrinol. Clin. 1967, 8, 6
53. JAYLE, M.F.
in Les Gonadotrophines en gynécologie
XXI Assises françaises de Gynécologie.
Masson, Paris 1962
54. JENKINS, D. ; FORSHAM, P.H. ; LAIDLAW, J.C. ; REDDY, W.J.
THORN, G.W.
Amer. J. Med. 1955, 18, 3
55. JENKINS, J.S. ; MEAKIN, J.W. ; NELSON, H.
Science 1958, 128, 478
56. JENSEN, A.P.
Clin. Chim. Acta 1963, 8, 785

57. KAPPAS, A. ; GALLAGHER, T.F.
J. Clin. Invest. 1955, 34, 1556
58. KIRSHNER, M.A. ; LIPSETT, M.B.
J. Clin. Endocr. 1963, 23, 255
59. KIRSHNER, M.A. ; LIPSETT, M.B.
Steroids 1964, 3, 277
60. KIRSHNER, M.A. ; FALES, H.M.
Anal. Chem. 1962, 34, 1548
61. KELLIE, A.E. ; WADE, A.P.
Biochem. J. 1957, 66, 196
62. KRAIEM, Z. ; LUNENFELD, B. ; SKALKA, J.
Acta Endocr. 1969, 61, 1
63. LANGER, S.H. ; FRIEDAL, R.A. ; WENDER, J. ;
SHARKEY, A.C.
Anal. Chem. 1958, 30, 1353
64. LIDDLE, G.W. ; ISLAND, D. ; LANCE, E.M. ; HARRIS, A.P.
J. Clin. Endocr. 1958, 18, 906
65. LIDDLE, G.W. ; ISLAND ; ESTEP, H. ; TOMKINS, G.M.
J. Clin. Invest. 1958, 37, 912
66. LIDDLE, G.W. ; WILLIAMS, W.C. Jr.
in The human adrenal cortex.
Eds. Currie, A.R. ; Symington, T. ; Grant, J.K.
Edinburgh Livingstone 1962, page 461
67. McFADDEN, W.H. ;
Separation Science 1966, 1, 723
68. MAHESH, V.B. ; GREENBLATT, R.B. ; AYDAR, C.K. ; ROY, S. ;
PUEBLA, R.A. ; ELLEGOOD, J.O.
J. Clin. Endocr. 1964, 24, 1283
69. MAKITA, M. ; WELLS, W.W.
J. Clin. Endocr. 1963, 5, 523

70. MARTIN, A.J.P. ; SYNGE, R.L.M.
Biochem. J., 1941, 35, 1358
71. MOOLENAR, A.J. ; VANSETERS, A.P.
Acta Endocr. 1971, 67, 303
72. LUUKKAINEN, T. ; VANDENHEUVEL, W.J.A. ; HAATI, E.O.A. ;
HORNING, E.C.
Biochim. Biophys. Acta 1961, 52, 599
73. NORMAN, N.
Acta Endocr. 1962, 40, 375
74. OERTEL, G.W. ; GROOT, K.
Clin. Chim. Acta 1965, 11, 512
75. PAL, S.B.
Clin. Chim. Acta 1967, 15, 57
76. PANICUCCI, F.
Proceedings 2nd Symposium on Steroid Hormone
Excerpta Medica Foundation 1965, page 25
77. PURNELL, H.
Gas chromatography, J. Wiley and Sons Inc. New York 1962
78. RAMAN, P.B. ; AVRAMOV, R. ; McNIVEN, N.L. ; DORFMAN, R.I. ;
Steroids 1965, 6, 177
79. ROCHE, J. ; MICHEL, R. ; JOUAN, P. ; CORMIER, J.
C.R. Soc. Biol. 1959, 153, 1904
80. ROS, A.
Monit. Ostet. Ginec. 1968, 389
81. RIVERA, R. ; DORFMAN, R.I. ; FORCHIELLI, E.
Acta Endocr. 1967, 54, 37

82. RUBIN, B.L. ; DORFMAN, R.I. ; PINCUS, G.
Rec. Prog. Horm. Res. 1954, 2, 213
83. RYHAGE, R.
Anal. Chem. 1964, 36, 759
84. SAVARD, K. ; MARSH, J.M. ; RICE, B.F.
Rec. Progr. Horm. Research 1965, 21, 285
85. SPARAGANA, M.
Steroids 1965, 6, 583
86. STARNES, W.R. ; PARTLOW, T.F. ; GRAMMER, M.C. ;
KORNEL, L. ; HILL, S.R. Jr.
Anal. Biochem. 1963, 6, 82
87. THOMAS, B.S. ; BULBROOK, R.D.
Proceedings 2nd Symposium on Steroid Hormones
Excerpta Medica Foundation 1965, page 49
88. THORN, G.W. ; FORSHAM, P.H. ; PRUNTY, F.T.G. ; HILLS, A.G.
J. Amer. Med. Ass. 1948, 137, 1005
89. TURNER, D.A. ; SEEGER, J. ; SARLOS, I. ; BARNES, A.C. ;
COHEN, R.
Anal. Biochem. 1963, 5, 99
90. UOZUMI, T. ; MANABE, H. ; TANAKA, H. ; HAMANAKA, Y. ;
KOTOH, K. ; SUZUKI, K. ; MATSUMOTO, K.
Acta Endocr. 1969, 61, 17
91. VANDENHEUVEL, W.J.A. ; SWEELEY, C.C. ; HORNING, E.C. ;
J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 3481
92. VANDENHEUVEL, W.J.A. ; CREECH, B.G. ; HORNING, E.C.
Anal. Biochem. 1962, 4, 191
93. VANDENHEUVEL, W.J.A. ; GARDINER, W.L. ; HORNING, E.C. ;
Anal. Chem. 1964, 36, 1550

94. VANDENHEUVEL, W.J.A. ; HORNING, E.C.
Biochim. Biophys. Acta 1962, 64, 416
95. VANDENHEUVEL, W.J.A. ; GARDINER, W.L. ; HORNING, E.C.
J. Chromatog. 1967, 26, 387
96. VÖLLMIN, J.A.
Clin. Chim. Acta 1971, 34, 307
97. WATSON, J.T. ; BIEMANN, K. ;
Anal. Chem. 1964, 36, 1135
98. WOTIZ, H.H.
Biochim. Biophys. Acta 1963, 69, 415
99. WOTIZ, H.H. ; MARTIN, H.F.
J. Biol. Chem. 1961, 236, 1312
100. ZAMORA, E. ; PLATTNER, D. ; CURTIUS, H.C.
Acta Endocr. 1969, 62, 315

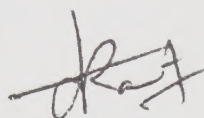
TABLE DES MATIERES

<u>CHAPITRE I</u> : Rappel de biosynthèse et de métabolisme	1
<u>CHAPITRE II</u> : Matériel et méthodes	8
*Chromatographie en phase gazeuse	22
* Combinaison Chromatographie-Spectrométrie de masse	27
* Scintillation liquide	28
* Préparation de l'extrait biologique	28
<u>CHAPITRE III</u> : Résultats	39
<u>CHAPITRE IV</u> : Discussion	48
<u>CHAPITRE V</u> : Application en recherche métabolique	69
<u>CONCLUSION</u>	77
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> :	78

VU

Grenoble, le 1 Nov 1972

le Président de la thèse



A. RASSAT

VU, et permis d'imprimer,

Grenoble, le

le Président de l'Université
Scientifique et Médicale

